

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Генная инженерия растений

Лабораторное руководство

Под редакцией

ДЖ. ДРЕЙПЕРА и др.

Перевод с английского

Г. И. Эйснера

В.М. Андрианова

ОГЛАВЛЕНИЕ



Москва «Мир» 1991

ББК
Г.
УДК

Книга выпущена при финансовой поддержке
Института общей генетики АН СССР

Авторы:

Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Дьюри Г., Джэкоб Л.,
Уолден Р., Кумар А., Джефферсон Р., Хэмил Дж.

Г Генная инженерия растений. Лабораторное руководство:
Пер. с англ./Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Арми-
тиджа, Р. Уолдена. — М.: Мир, 1991. — 408 с., ил.
ISBN 5-03-001854-9

Сборник методов по генетической трансформации растений и анализу экспрес-
сии генов написан английскими специалистами. Подробное обсуждение теоретиче-
ских основ методов и четкость изложения практического материала позволяют
рекомендовать книгу в качестве руководства для начинающих исследователей.
Для молекулярных биологов и генетиков растений.

Г $\frac{2001020000-112}{056(01)-91}$ 92—90

ББК

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001854-9 (русск.)
ISBN 0-632-02172-1 (англ.)

© 1988 by Blackwell Scientific Publications
© перевод на русский язык, Эйсер Г. И.,
Андрянов В. М., 1991

Оглавление

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	6
Список авторов	8
Список сокращений	9
Глава 1. Агробактериальные трансформирующие векторы растений. Ф. Армитидж, Р. Уолден, Дж. Дрейнер	11
1.1. Введение	11
1.1.1. Индукция опухолей агробактерий	11
1.1.2. Ti-плазмиды <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
1.1.3. Ri-плазмиды <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	14
1.1.4. Механизм переноса T-ДНК	15
1.1.5. Плазмиды агробактерий как векторы для трансформации	17
1.1.6. Основные компоненты неонкогенных Ti-плазмидных векторов	18
1.1.7. Неонкогенные векторы общего назначения на основе Ti-плазмид, используемые для трансформации растений	18
1.1.8. Векторы для трансформации растений с помощью <i>A. rhizogenes</i>	26
1.1.9. Использование специальных трансформирующих векторов на основе Ti-плазмид	27
1.1.10. Выбор Ti-плазмидной векторной системы агробактерий	29
1.1.11. Клонирование в векторах для трансформации растений	35
1.2. Общие молекулярно-биологические рекомендации	37
1.3. Культивирование и хранение бактериальных штаммов	39
1.3.1. Обеспечение	39
1.3.2. Нарастивание ночных бактериальных культур	40
1.3.3. Рассев бактериальных культур для получения отдельных колоний	40
1.3.4. Длительное хранение бактериальных штаммов	41
1.3.5. Приготовление чашек для селекции бактерий	41
1.4. Препаративное выделение плазмид из <i>E. coli</i> в больших объемах	42
1.4.1. Основные положения	42
1.5. Выделение и очистка рестрикционных фрагментов ДНК для лигирования	49
1.5.1. Основные положения	49
1.5.2. Очистка фрагментов ДНК после гидролиза рестриктазами	49
1.5.3. Удаление 5'-фосфатных групп фрагментов ДНК с помощью фосфатазы из кишечника теленка	50
1.5.4. Электроолюция рестрикционных фрагментов из агарозных гелей	51
1.5.5. Очистка специфических рестрикционных фрагментов путем фильтрования центрифугированием	53
1.6. Лигирование фрагментов ДНК с векторами для трансформации растений	54
1.6.1. Основные положения	54
1.6.2. Обеспечение	58
1.6.3. Методика (модифицировано по [39])	59
1.7. Введение рекомбинантных плазмид в клетки <i>E. coli</i> с помощью трансформации	61
1.7.1. Основные положения	61
1.7.2. Обеспечение	63
1.7.3. Методика	64
1.8. Быстрое выделение небольших количеств плазмидной ДНК <i>E. coli</i>	67
1.8.1. Основные положения	67
1.8.2. Обеспечение	69
1.8.3. Методика (модифицировано по [10])	70
1.9. Анализ мини-препаратов ДНК с помощью рестрикционного гидролиза и электрофореза в агарозном геле	71
1.9.1. Основные положения	71
1.10. Конъюгационный перенос рекомбинантных плазмид в агробактерии	72
1.10.1. Основные положения	72
1.10.2. Обеспечение	74
1.10.3. Методика	75
1.11. Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из <i>A. tumefaciens</i>	76
1.11.1. Основные положения	76
1.11.2. Обеспечение	76
1.11.3. Методика (модифицирована по [17])	77
1.12. Рестрикционный гидролиз тотальной ДНК агробактерий	78
1.12.1. Основные положения	78
Приложение 1 [I]	80
Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований	80
Приложение 1 [II]	82
А. Используемые в примерах бактериальные штаммы	82
Б. Антибиотики, используемые для селекции бактерий	82
Литература	83
Глава 2. Трансформация клеток двудольных растений с помощью Ti-плазмид <i>Agrobacterium tumefaciens</i> и Ri-плазмид <i>A. rhizogenes</i>. Дж. Дрейнер, Р. Скотт, Дж. Хэмил	87
2.1. Введение	87
2.1.1. Основные свойства агробактерий и векторов, которые используются для трансформации клеток растений	88
2.1.2. Поведение культивируемых растительных клеток, влияющее на их трансформацию агробактериями	92
2.1.3. Селекция трансформированных тканей и регенерация растений	95
2.1.4. Основные методы трансформации растительных клеток с помощью агробактериальных векторов	103
2.2. Трансформация с помощью онкогенных штаммов дикого типа <i>A. tumefaciens</i> и <i>A. rhizogenes</i>	105
2.2.1. Основные положения	105
2.2.2. Обеспечение	110
2.2.3. Методика	111
2.3. Трансформация больших гетерогенных эксплантатов с помощью неонкогенных Ti-плазмидных векторов	117
2.4. Прямая регенерация трансформированных растений: трансформация листовых дисков табака	119
2.4.1. Основные положения	119
2.4.2. Обеспечение	121
2.4.3. Методика	122
2.5. Регенерация трансформированных растений через стадию каллуса: трансформация эксплантатов проростков льна	130
2.5.1. Основные положения	130
2.5.2. Получение стерильных проростков льна и регенерация из эксплантатов проростков льна	132
2.5.3. Трансформация гипокотилей, регенерация из трансформированного каллуса, селекция, размножение и укоренение трансформированных побегов	135
2.6. Трансформация малых гомогенных эксплантатов	140
2.6.1. Основные положения	140
2.6.2. Разработка систем совместного культивирования	141
2.7. Выделение мезофильных протопластов табака	143
2.7.1. Основные положения	143
2.7.2. Обеспечение	145
2.7.3. Методика	146
2.8. Культивирование мезофильных протопластов табака	149
2.8.1. Основные положения	149
2.8.2. Обеспечение	150
2.8.3. Методика	150
2.9. Трансформация протопластов путем совместного культивирования с агробактериями	151
2.9.1. Основные положения	151
2.9.2. Обеспечение	152
2.9.3. Методика	153
2.10. Трансформация клеток суспензионной культуры моркови	160
2.10.1. Основные положения	160
2.10.2. Инициация проэмбриогенных суспензионных клеточных культур моркови, приготовление фидерных чашек и высев на переносные диски	165
2.10.3. Инокуляция клеток моркови агробактериями, селекция трансформантов и регенерация путем соматического эмбриогенеза	167
Приложение 2 [I]	170
Обычные материалы для работы с культурой тканей	170
Приложение 2 [II]	171
Среда для культуры растительных клеток и тканей	171
Приложение 2 [III]	175
Антибиотики, добавляемые в среды для культур растительных клеток	175
Приложение 2 [IV]	176
Подготовка эксплантатов для инокуляции агробактериями	176
Приложение 2 [V]	178
Растворы для выделения протопластов табака	178
Приложение 2 [VI]	179
Выделение протопластов из измельченных кусочков листа	179
Приложение 2 [VII]	180
Методы флуоресцентного окрашивания для контроля развития растительных протопластов	180
Приложение 2 [VIII]	181
Примеры процедур генетической трансформации растений, основанных на системе переноса генов агробактерий	181
Литература	181

Дальше ➡

Глава 3. Трансформация растительных клеток путем трансфекции ДНК. Дж. Дрейпер, Р. Скотт, А. Кумар, Г. Дьюри	194
3.1. Введение	194
3.1.1. Ограничения системы трансформации с помощью агробактерий	194
3.1.2. Трансформация растительных протопластов изолированной векторной ДНК	196
3.1.3. Разработка стратегий трансформации протопластов путем трансфекции ДНК	197
3.1.4. Векторы для переноса генов посредством ДНК (DMGT-векторы)	199
3.1.5. Трансформация интактных растительных тканей DMGT-векторами	201
3.2. Трансфекция протопластов с помощью полиэтиленгликоля	203
3.2.1. Основные положения	203
3.2.2. Стимулируемое ПЭГ поглощение ДНК протопластами	205
3.2.3. Выделение ДНК из протопластов и дот-блоттинг-гибридизация	206
3.3. Трансформация протопластов с помощью электропорации	212
3.3.1. Основные положения	212
3.3.2. Оптимизация методик электропорации с помощью временной экспрессии	216
3.4. Трансформация растительных клеток путем микроинъекций	221
3.4.1. Основные положения	221
3.4.2. Трансформация растений путем микроинъекций	223
Приложение 3 [I] Выделение протопластов из клеток суспензионной альбинотической культуры <i>Petunia hybrida</i> (сорт Blue Lace)	232
Литература	232
Глава 4. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений. Дж. Дрейпер, Р. Скотт	236
4.1. Введение	236
4.1.1. Выделение ДНК	236
4.1.2. Выделение РНК	238
4.2. Выделение тотальной ДНК из лиофилизированных тканей растений	239
4.2.1. Общие положения	239
4.2.2. Выделение небольших количеств ДНК с помощью СТАВ-буфера	241
4.2.3. Выделение ДНК с помощью протеиназы	245
4.3. Выделение ДНК из свежего растительного материала	248
4.3.1. Общие положения	248
4.3.2. Выделение больших количеств тотальной ДНК из свежего растительного материала с помощью СТАВ-буфера	249
4.3.3. Выделение ДНК из свежих тканей с помощью ДСН	249
4.3.4. Выделение ДНК из свежих тканей с помощью ДСН и протеиназы К	252
4.4. Выделение ядерной ДНК	254
4.4.1. Выделение ядерной ДНК из свежих каллусов или листьев	254
4.4.2. Выделение ядерной ДНК из протопластов	257
4.5. Выделение ДНК из хлоропластов и митохондрий	258
4.5.1. Общие положения	258
4.5.2. Обеспечение	259
4.5.3. Методика	260
4.6. Определение концентрации ДНК в неочищенных препаратах нуклеиновых кислот с помощью дифениламина	262
4.6.1. Общие положения	262
4.6.2. Обеспечение	263
4.6.3. Методика	264
4.7. Выделение тотальной РНК из растений	265
4.7.1. Общие положения	265
4.7.2. Фенольный метод выделения тотальной РНК из растений	265
4.7.3. Метод выделения тотальной РНК из растений при помощи хлористого лития	269
4.8. Выделение poly(A) ⁺ -мРНК	270
4.8.1. Общие положения	270
4.8.2. Обеспечение	271
4.8.3. Методика	272
Приложение 4 [I] Выделение больших количеств тотальной ДНК из клеток растений с помощью СТАВ	273
Приложение 4 [II] Очистка ДНК из растений в градиентах CsCl/БЭ	274
Литература	276
Глава 5. Анализ ДНК путем рестрикции и гибридизации по Саузерну. Р. Скотт	277
5.1. Введение	277
5.2. Обработка ДНК ферментами рестрикции	278
5.2.1. Общие положения	278
5.2.2. Обеспечение	279
5.2.3. Методика	279
5.3. Фракционирование ДНК методом электрофореза в агарозном геле	280
5.3.1. Общие положения	280
5.3.2. Обеспечение	281
5.3.3. Методика	282
5.4. Блоттинг по Саузерну обработанных рестриктазами и разделенных фрагментов ДНК	287
5.4.1. Общие положения	287
5.4.2. Обеспечение	288
5.4.3. Методика	289
5.5. Гибридизация ДНК, перенесенной на мембраны с помощью блоттинга по Саузерну	293
5.5.1. Общие положения	293
5.5.2. Обеспечение	293
5.5.3. Методика	295
5.6. Мечение препаратов для гибридизации с помощью олигонуклеотидной затравки	297
5.6.1. Общие положения	297
5.6.2. Обеспечение	298
5.6.3. Методика	299
Приложение 5 [I] Буферы для рестриктаз	301
Приложение 5 [II] Концевое мечение маркеров, полученных на основе ДНК фага λ	302
Приложение 5 [III] Определение включения метки в ДНК	302
Литература	303
Глава 6. Анализ организации и экспрессии генов растений. Р. Скотт, Дж. Дрейпер, Р. Джефферсон, Г. Дьюри, Л. Джеккоб	304
6.1. Введение	304
6.1.1. Принцип организации генов растений	304
6.1.2. Строение мРНК	306
6.1.3. Перенос продуктов генов в клетку	306
6.1.4. Использование генетической трансформации для изучения экспрессии генов растений	307
6.1.5. Использование трансгенных растений для изучения последовательностей, регулирующих транскрипцию	308
6.1.6. Изучение регуляторных последовательностей с помощью индикаторных генов	308
6.2. Изучение организации Т-ДНК методом блоттинг-гибридизации по Саузерну	311
6.2.1. Общие положения	311
6.2.2. Организация последовательностей чужеродной ДНК в тканях растений	313
6.2.3. Изучение организации Т-ДНК в трансгенных растениях моркови методом блоттинг-гибридизации	317
6.3. Анализ экспрессии генов методом точечного нозери-блоттинга	324
6.3.1. Регуляция транскрипции гена <i>Cab</i> в этилированном растении гороха под действием фитохрома	326
6.4. Использование CAT в качестве индикаторного гена для изучения контроля экспрессии генов в различных органах и при изменении условий среды	331
6.4.1. Общие положения	331
6.4.2. Определение активности хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)	333
6.4.3. Примеры использования <i>cat</i> в качестве индикаторного гена для изучения контроля экспрессии гена <i>Cab-cat</i> в различных органах и в зависимости от условий среды	336
6.5. Применение неомидифосфотрансферазы-II (NPT-II) в качестве индикаторного белка для изучения роли последовательностей, участвующих в переносе белков (транзитных пептидов)	340
6.5.1. Общие положения	340
6.6. Выделение интактных хлоропластов табака	343
6.6.1. Общие положения	343
6.6.2. Обеспечение	344
6.6.3. Методика	345
6.7. Определение активности NPT-II in situ	346
6.7.1. Общие положения	346
6.7.2. Неденатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле	347
6.7.3. Определение NPT-II in situ после электрофореза	352
6.8. Определение NPT-II методом вестерн-блоттинга	357
6.8.1. Общие положения	357
6.9. Получение химерных генов с последовательностями, кодирующими индикаторный фермент: система слияния с геном GUS	362
6.9.1. Общие положения	363
6.9.2. Слияние с геном GUS	364
6.9.3. Определение активности GUS в экстрактах растений	366
6.9.4. Выделение GUS из тканей растений	366
6.9.5. Флуориметрическое определение активности GUS	368
6.9.6. Выявление GUS in situ с использованием денатурирующего полиакриламидного геля	371
6.9.7. Гистохимическое выявление GUS на срезах тканей растений	374
6.10. Определение нопалина в трансформированных растительных тканях	377
6.10.1. Общие положения	377
6.10.2. Обеспечение	378
6.10.3. Методика	379
Приложение 6 [I] Нозери-блоттинг	383
Приложение 6 [II] Выделение NPT-II и CAT из бактерий	385
Приложение 6 [III] Определение концентрации белка по Бредфорду	386
Приложение 6 [IV] Определение агропинна и маниопина	386
Литература	387
Список фирм, поставщиков реактивов и оборудования	391
Предметный указатель	395
Указатель латинских названий	398
Указатель методик	400

Предисловие редактора перевода

С этой книгой я впервые ознакомился, когда писал на нее рецензию для журнала «Новые книги за рубежом», и тогда же настоятельно рекомендовал перевести. Прочитав ее как редактор, я еще более уверенно могу рекомендовать это пособие всем, кто хочет применить современные методы в работе с растениями. Думаю, никакое современное исследование в области генетики, физиологии, биохимии, да и многих направлений селекции не может обойтись без применения методов молекулярной биологии и генной инженерии. С этой точки зрения данная книга на редкость удачна. Во-первых, она включает все необходимые методики и не содержит практически ничего лишнего. Во-вторых, она тщательно отредактирована и выдержана в одном стиле. В-третьих, очень хорошо и доступно изложены сложные проблемы. Например, выбирая с помощью этой книги вектор для трансформации, читатель легко может составить всестороннее представление о проблеме. При этом авторы не углубляются в чрезмерные детали, а списки литературы достаточно полны, чтобы читатель разобрался в тонкостях самостоятельно (можно дополнительно рекомендовать книгу Э. С. Пирузян, В. М. Андрианов «Плазмиды агробактерий и генная инженерия», М., Наука, 1985). Наконец, в-четвертых, простые и наглядные иллюстрации несомненно облегчат воспроизведение описанных методик. Привлекает и стремление авторов связать описываемые методы с решением актуальных научных задач, давая соответствующие примеры, что называется, со стола.

Недостатки книги минимальны, и некоторые мелкие погрешности исправлены в примечаниях. Кое-где мы с переводчиками предлагали в примечаниях отечественные замены для импортных реактивов и оборудования, хотя, к сожалению, далеко не везде это было возможно.

В заключение я могу выразить уверенность, что данная книга займет такое же место на столах и полках исследователей в области генетики и молекулярной биологии растений, какое в свое время заняла книга Маниатиса и др. «Молекулярное клонирование», М., Мир, 1984 в работе всех молекулярных биологов. Надеюсь, что она привлечет внимание селекционеров и в какой-то степени заполнит огромный разрыв между практической селекционной работой и фундаментальной наукой о растениях, существующий в нашей стране. Единственное, о чем остается пожалеть, что ее не удалось издать в том виде, как она вышла в оригинале,— в прочной пластиковой обложке и сброшюрованной на пластмассовой пружинке, специально для использования на лабораторном столе.

А. М. Колчинский

Предисловие

Настоящее руководство основано на материалах курса, прочитанного в декабре 1986 года в Лестерском университете. Это был пятый из проводившихся в университете курсов, посвященных генетической инженерии. Участники всех предыдущих курсов по клонированию генов выразили желание выйти за рамки основных приемов клонирования генов и особенно интересовались молекулярной биологией и генетической инженерией эукариот. Таким образом, Курс генетической трансформации растений и экспрессии генов представляет собой нашу первую попытку организовать программу, посвященную определенной группе организмов, отвечающую этой потребности. Как Курс, так и это Практическое руководство не были бы созданы, если бы не самоотверженность и энтузиазм преподавателей и неоценимые организаторские способности технической дирекции и администрации. Приносим благодарность и многим научным сотрудникам, ассистентам, аспирантам и техническому персоналу, которые не только потратили много сил, чтобы наладить большинство методик, демонстрируемых во время Курса, но и отдали свое время и энергию, чтобы помочь организовать научную программу. Поддержка профессора Харри Смита (возглавляющего Отдел ботаники) также не осталась незамеченной, поскольку инициатива проведения этого Курса исходила в значительной степени от него.

И наконец, нам бы хотелось поблагодарить за финансовую поддержку Управление биотехнологии Комиссии по научно-техническим исследованиям Великобритании и Отдел биотехнологии Министерства труда и промышленности. Мы также благодарны за щедрость многим компаниям, перечисленным в конце руководства, которые предоставляли материалы и оборудование, используемые в Курсе.

Руководство предназначено для исследователей, имеющих некоторый навык в работе с культурами растительных тканей и знакомых с методами молекулярной биологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые хотели бы использовать свой опыт в фундаментальных или прикладных исследованиях с применением трансгенных растений. В целом нами сделана попытка представить сбалансированный обзор подходов, которые исполь-

зуются в генетической инженерии растений, а именно культуры тканей и клеток растений, манипуляций с векторами и некоторых основных приемов технологии рекомбинантных ДНК, техники переноса генов и современных молекулярных аналитических методов изучения белков и нуклеиновых кислот. В каждой области мы старались изложить теоретические основы методов, чтобы помочь опытному исследователю, однако учебник представляет собой прежде всего практическое руководство.

Мы постарались представить исчерпывающий обзор современных методов генетической трансформации растений и, насколько это возможно, подходов к анализу экспрессии генов. Представляя читателю громадное число видов растений и широкую область молекулярных технологий, неизбежно пришлось опустить некоторые важные методы. Чтобы внести ясность, следует также отметить, что для описания различных приемов трансформации и разнообразных молекулярных процедур были использованы вполне определенные растительные системы. Следует иметь в виду, что большинство протоколов предназначено в качестве руководства для разработки аналогичных методик для других типов растительного материала.

Генетическая инженерия растений возникла из небытия десятилетие назад, чтобы превратиться в основной предмет как фундаментальной молекулярной генетики эукариот, так и коммерческой биотехнологии. Возможности будущего использования этой технологии огромны, и следующее десятилетие обещает быть захватывающим.

Джон Дрейпер

Список авторов

- J. Draper, R. Scott, Ph. Armitage, G. Dury, L. Jacob**
Botany Department, University of Leicester, University Road,
Leicester LE1 7RH UK
- R. Walden**
Leicester Biocentre, University of Leicester
- A. Kumar**
Department of Genetics, University of Leeds, Leeds LS2 9JT UK
- R. Jefferson**
Department of Molecular Genetics, Plant Breeding Institute,
Maris Lane, Trumpington, Cambridge CB2 2LQ UK
- J. Hamil**
Institute of Food Research, Colney Lane, Norwich NR4 7UA UK

Список сокращений

АБК	— абсцизовая кислота
6-БАП	— 6-бензиламинопурин
БЭ	— бромистый этидий
ВМЦК	— вирус мозаики цветной капусты
ДМА	— диметилаллил
2,4-Д	— дихлорфеноксиуксусная кислота
ДСН	— додецилсульфат натрия
ДТТ	— дитиотреитол
ИПТГ	— изопропилтио- β -D-галактопиранозид
ИУК	— индолилуксусная кислота
л	— линейная форма молекулы ДНК
МС	— малая субъединица
МЭ	— меркаптоэтанол
НУК	— нафтилуксусная кислота
ПААГ	— полиакриламидный гель
п. н.	— пары нуклеотидов
РБФКО	— рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа
РБФК/О/МС	— ген малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы
ТАЭ	— буфер, содержащий 400 мМ трис-ацетат и 10 мМ ЭДТА
ТНС	— триизопропилнафталинсульфонат
т. п. н.	— тысячи пар нуклеотидов
ТХУ	— трихлоруксусная кислота
ТЭ-буфер	— буфер, содержащий 10 мМ трис-НСl (рН 7,5) и 1 мМ ЭДТА
ФМСФ	— фенилметилсульфонилфторид
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота
Ас	— ацетосирингон
acs	— ген агроцинопинсинтазы
Ар	— ампициллин
Ар ^r	— устойчивость к ампициллину
Вl	— блеомицин
Сab	— хлорофилл a/b-связывающий белок
Сab	— ген хлорофилл a/b-связывающего белка

cab	— промотор гена хлорофилл а/б-связывающего белка
CaMV	— вирус мозаики цветной капусты
CAT	— хлорамфениколацетилтрансфераза
cat	— ген хлорамфениколацетилтрансферазы
Cb	— карбенициллин
ccc	— ковалентнозамкнутая кольцевая форма ДНК (от англ. covalently closed circle)
Cm	— хлорамфеникол
CTAB	— цетилтриэтиламмоний бромид (от англ. cetyl triethylammonium bromide)
Cx	— цефотаксим
DMGT	— перенос генов посредством ДНК (от англ. DNA-mediated gene transfer)
Gm	— гентамицин
GUS	— глюкуронидаза
HEPES	— N-2-гидроксиэтилпиперазин - N'-2-этансульфо- новая кислота
Hm	— гигромицин
Km	— канамицин
Km ^r	— устойчивость к канамицину
lux	— люцифераза
MOPS	— 3-морфолинопропансульфоновая кислота
Mt	— метотрексат
4-MU	— 4-метилумбеллиферон
MUG	— метилумбеллиферилглюкуронид
NA	— питательный агар (от англ. Nutrient Agar)
NB	— питательный бульон (от англ. Nutrient Broth)
Nop	— нопагин
nos	— ген нопагинсинтазы
pos	— промотор гена нопагинсинтазы
NPT-II	— неомицинфосфотрансфераза
npt-II	— ген неомицинфосфотрансферазы
oc	— открытая кольцевая форма ДНК (от англ. open circle)
ocs	— ген октопинсинтазы
Rf	— рифампицин
Sm	— стрептомицин
Sp	— спектиномицин
SSC	— стандартный солевой раствор (0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия, рН 7,0)
Tc	— тетрациклин
TEMED	— N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
tzs	— транс-зеатинсинтаза
X-GAL	— 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид

Агробактериальные трансформирующие векторы растений

Ф. Армитидж, Р. Уолден, Дж. Дрейпер

1.1. Введение

1.1.1. Индукция опухолей агробактериями

Agrobacterium tumefaciens и *A. rhizogenes* представляют собой почвенные бактерии, которые в участках поранения двудольных растений вызывают заболевания, называемые соответственно «корончатым галлом» и «косматым корнем». Среди одностольных растений только некоторые представители семейств *Liliaceae* и *Amaryllidaceae* оказались в слабой степени восприимчивы к заболеванию корончатых галлов (обзорные данные приведены ниже). Причины подобного ограничения круга хозяев в настоящее время не раскрыты. Однажды начавшись, опухолевый рост может продолжаться и в отсутствие бактерий, а опухолевая ткань способна расти в аксеничных условиях в культуре на питательной среде, не содержащей экзогенных ауксинов и цитокининов, которые в норме необходимы для стимуляции роста растительных тканей *in vitro*.

Опухолевые ткани синтезируют новые производные аминокислот и сахаров, известные как опины. Тип опиона, синтезируемого в опухоли (например, нопалин, октопин, агроцинопин, манинопин и агропин), зависит от штамма агробактерий, вызвавшего ее образование. Октопин и нопалин — опины, образующиеся из аргинина; их легче всего обнаружить в ткани корончатых галлов. В соответствии с этим многие широко распространенные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* классифицируют как штаммы октопинового или нопалинового типа. В опухолях косматого корня, вызываемых *A. rhizogenes*, как правило, обнаруживается агропин — производное одного из сахаров. Штаммы агробактерий, вызывающие образование опухолей, способны к избирательному катаболизму опинов того типа, синтез которых индуцируют, используя последние в качестве источников углерода и азота.

Как индукция опухолей, так и синтез опинов обусловлены бактериальными мегаплазмидами — Ti-плазмидами (от англ. Tumour inducing) в случае *A. tumefaciens* и Ri-плазмидами (от англ. Root inducing) в случае *A. rhizogenes*. Молекулярно-биологические основы опухолеобразования подробно рассмотрены в обзорах [33, 13, 22, 50].

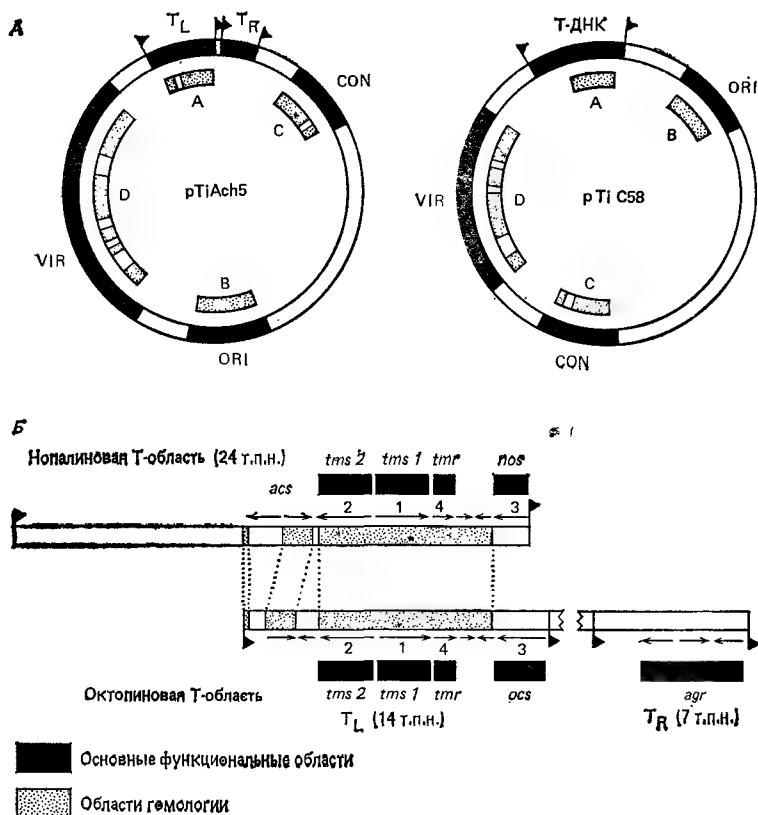


Рис. 1.1. Общая организация и экспрессия Тi-плазмид октопинового и нопалинового типов.

А. Карты Тi-плазмид октопинового (pTiAch5) и нопалинового (pTiC58) типов, показывающие относительное расположение и размеры основных функциональных областей. Области наиболее сильной гомологии между двумя плазмидами имеют черный цвет. Флажками обозначены прямые повторы длиной 25 п. н.; CON — области, кодирующие функции конъюгации; ORI — область репликации и начала репликации (ориджин); VIR — область вирулентности; Т-ДНК, T_L и T_R — области, содержащие Т-ДНК (от англ. Transferred). **Б.** Карты Т-областей плазмид нопалинового и октопинового типов; показаны основные функциональные домены, области гомологии и транскрипты. Продукты транскрипции, идентифицированные к моменту написания книги, обозначены: 3 (*nos*) — нопалинсинтаза, 3 (*ocs*) — октопинсинтаза, *acs* — агроцинопинсинтаза, 1 (*tms1*) — триптофанмонооксигеназа, 2 (*tms2*) — индол-3-ацетамидгидролаза, 4 (*tmsr*) — диметилаллил (DMA)-трансфераза, *agr* — три транскрипта, необходимые для синтеза агропина.

1.1.2. Ti-плазмиды

Agrobacterium tumefaciens

Ti-плазмиды (рис. 1.1, А), обнаруженные во всех вирулентных штаммах *A. tumefaciens*, имеют размеры около 200—250 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) и стабильно сохраняются в агробактериях при температуре ниже 30 °С. Согласно данным ДНК-ДНК-гибридизации и гетеродуплексного картирования, в Ti-плазмидах различных штаммов агробактерий имеются четыре области гомологии. Генетический анализ показал, что две области, Т-ДНК (от англ. Transferred) и *vir*-область (от англ. virulence), связаны с опухолообразованием, тогда как две другие вовлечены в конъюгационный перенос и репликацию плазмид в клетках агробактерий.

В процессе опухолообразования определенная последовательность Ti-плазмиды, Т-ДНК, переносится в клетки растения и встраивается в их ядерный геном. Т-ДНК стабильна в растительном геноме. Как показала гибридизация опухолевой ДНК со специфичным Ti-плазмидным зондом, содержащаяся в растительных клетках Т-ДНК колинеарна исходной Т-ДНК Ti-плазмиды агробактерий, что свидетельствует об отсутствии заметных перестроек в последовательности плазмидной ДНК в процессе генерации опухоли. В растительную ДНК может включаться одна или более копий Т-ДНК, и хотя множественные копии Т-ДНК могут образовывать tandemные повторы, они могут быть разбросаны по геному и сцеплены с различными районами растительной ДНК. Место встраивания Т-ДНК в растительную ДНК, по-видимому, случайно. В различных Ti-плазмидах найдены области, гомологичные Т-ДНК (рис. 1.1, Б). В обычно используемых нопаиновых штаммах *A. tumefaciens* размер области Т-ДНК составляет около 24 т. п. н. В некоторых корончатых галлах октопинового типа выявлены два несмежных сегмента T_L и T_R . Последовательность T_L (14 т. п. н.) обнаружена во всех линиях трансформированных клеток и функционально эквивалентна Т-ДНК нопаиновых клеточных линий. T_R (7 т. п. н.), которая происходит из района Ti-плазмиды, локализуемого правее T_L -ДНК, обнаружена в некоторых опухолевых линиях, причем число ее копий может отличаться от такового для T_L . Последнее обстоятельство указывает на независимость процессов переноса T_L и T_R .

В опухолевых клетках Т-ДНК транскрибируется (рис. 1.1, Б) с образованием различных полиаденилированных мРНК. Количество накапливающихся в клетках транскриптов Т-ДНК относительно невелико по сравнению с другими растительными мРНК, а относительное их содержание может быть различным. Определение нуклеотидной последовательности Т-ДНК нопаи-

нового типа позволило идентифицировать 13 протяженных открытых рамок считывания, тогда как в октопиновых T_L- и T_R-ДНК обнаружено соответственно 8 и 6 протяженных открытых рамок. Транскрипты правой части нопалиновой Т-ДНК функционально эквивалентны транскриптам T_L-ДНК (рис. 1.1, Б). Общая организация генов Т-ДНК и их фланкирующих областей сходна с таковой эукариотических генов, хотя они не содержат интронов. Для выяснения функций продуктов, кодируемых отдельными генами Т-ДНК, использовали методы сравнения нуклеотидных последовательностей, делеционного и инсерционного мутагенеза, а также суперпродукции соответствующих белков в клетках *E. coli*. Один из генов октопиновой T_L-области (транскрипт 3) кодирует октопинсинтазу (*ocs*). В нопалиновых Ti-плазмидах гены опинсинтаз включают и гены нопалинсинтазы (*nos*), и агроцинопинсинтазы (*acs*). В октопиновых Ti-плазмидах T_R-область кодирует два белка, ответственных за синтез маннопина, и один — за превращение маннопина в агропин. Лocus *tmr* (транскрипт 4) кодирует фермент, участвующий в синтезе цитокинина; мутации в этом локусе приводят у некоторых растений к пролиферации корней из ткани корончатых галлов («gooty» или «корневые» мутанты). Локусы *tms1* и *tms2* (транскрипты 1 и 2) определяют нерегулируемый синтез ауксинов, и мутации в любом из них у многих типов растений обуславливают появление побегов из ткани корончатых галлов («shooty» или «побеговые» мутанты). Таким образом, Т-ДНК содержит гены (*tms1*, *tms2* и *tmr*), продукты которых препятствуют нормальной регуляции метаболических процессов, вовлеченных в синтез фитогормонов, что и приводит к онкогенному фенотипу. Следовательно, эти гены (*tms1*, *tms2* и *tmr*) можно отнести к так называемым *onc*-генам (подробнее см. разд. 2.1). Однако следует отметить, что входящие в состав Т-ДНК гены не участвуют в переносе Т-ДНК в растительные клетки и не влияют на ее стабильность в геноме растений.

1.1.3. Ri-плазмиды

Agrobacterium rhizogenes

Индукция заболевания косматого корня бактериями *A. rhizogenes* аналогична трансформирующему действию *A. tumefaciens*. Под контролем *vir*-области две отдельные области Т-ДНК плазмиды переносятся в растительный геном [16, 31]. Они получили название T_L (Т-левая Т-ДНК) и T_R (Т-правая Т-ДНК). T_R Т-ДНК содержит гены, кодирующие опины (маннопин или агропин), и соответственно этому штаммы характеризуют по их специфическим опиновым генам [16]. T_R Т-ДНК, кроме того, содержит два гена, кодирующие ауксин. Эти гены в значитель-

ной степени гомологичны ауксиновым генам *A. tumefaciens* и способны, как было показано, комплементировать мутации ауксиновых генов в штаммах *A. tumefaciens* [42]. T_L T-ДНК, напротив, не имеет гомологии с T-ДНК *A. tumefaciens* [31]. T_L T-ДНК *A. rhizogenes* полностью секвенирована; она содержит по крайней мере 11 открытых рамок считывания, сходных с эукариотическими, которые снабжены необходимыми элементами промоторов и сигналами полиаденилирования (последние должны функционировать после переноса в растительный геном, [48]). Эти гены не имеют гомологии ни с одним из известных генов, в них не обнаруживается и заметной гомологии с T-ДНК (октопинового типа) из *A. tumefaciens*. Для поддержания фенотипа косматого корня нет абсолютной необходимости в T_R T-ДНК, однако штаммы *Agrobacterium*, несущие как T_L, так и T_R T-ДНК, более вирулентны и заражают большее число видов растений, чем штаммы, несущие только одну T-ДНК [57].

1.1.4. Механизм переноса T-ДНК

Области T-ДНК как у *A. tumefaciens*, так и у *A. rhizogenes* фланкированы прямыми повторами длиной 25 пар нуклеотидов (п. н.) (см. рис. 1.1), и концы T-ДНК, интегрированной в растительный геном, обнаруживаются вблизи этих последовательностей. Обобщенную последовательность границы T-ДНК можно представить следующим образом:



Большинство исследований механизма переноса T-ДНК из агробактерий в клетку растения проводилось на *A. tumefaciens*. Удаление правой границы в Ti-плазмиде нопалинового типа нарушает образование опухоли, однако, когда олигонуклеотид длиной 25 п. н., гомологичный правой границе, встраивают в правильной ориентации в Ti-плазмиду, утратившую правую границу, опухолеобразование восстанавливается [58]. Последнее предполагает, что повторяющиеся последовательности длиной 25 п. н. являются как полярными, так и *цис*-действующими.

Контакт агробактерий с соединениями, выделяющимися из поврежденной ткани растения, приводит к транскрипции *vir*-области Ti-плазмиды (рис. 1.2). Одно из химических веществ, высокоактивных в этом отношении, было идентифицировано как ацетосирингон [49]. Гены *virA* и *virG* экспрессируются в вегетативно растущих бактериях, хотя *virG* транскрибируется на низком уровне. Считается, что при действии экссудата поврежденных растительных клеток или чистого ацетосирингона на агробактерии продукт гена *virA* (возможно, ассоциированный с мембраной) узнает и взаимодействует с ацетосирингоном, и передает

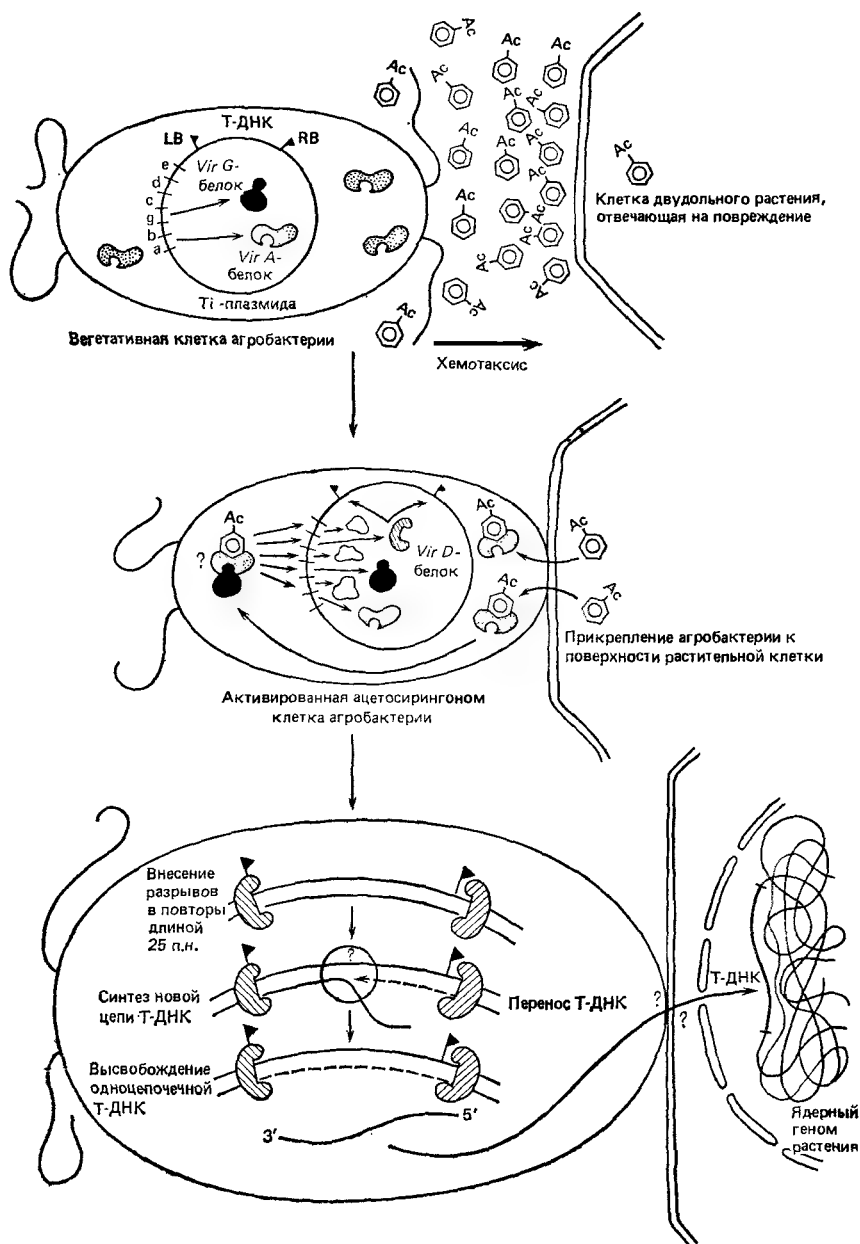


Рис. 1.2. Схема взаимодействий агробактерий с клетками растения и механизм переноса Т-ДНК (Ас — ацетосирингон).

этот внеклеточный сигнал внутрь клетки, что приводит к активации продукта гена *virG*. Измененный белок *virG* затем активирует остальные гены вирулентности (*virB*, *C*, *D* и *E*), а также повышает уровень транскрипции самого локуса *virG*.

Индукция *vir*-генов сопровождается появлением одноцепочечных разрывов внутри пограничных последовательностей длиной 25 п. н., фланкирующих Т-ДНК [1, 50], и одноцепочечных линейных молекул, которые соответствуют Т-ДНК (рис. 1.2). Предполагают, что соответствующей эндонуклеазной активностью обладают продукты оперона *virD* [60]. С помощью пока еще неизвестного механизма, который, возможно, аналогичен бактериальной конъюгации, Т-ДНК переносится в клетку растения и стабильно встраивается в ядерную ДНК [50]. Вероятно, что в этом процессе участвуют белки, кодируемые опероном *virE* [59]. Модель, описывающая ранние молекулярные события в процессе взаимодействия между растением и агробактериями во время образования корончатых галлов [37], представлена на рис. 1.2.

1.1.5. Плазмиды агробактерий как векторы для трансформации

Природная способность агробактерий переносить определенные последовательности ДНК в растительный геном была использована при конструировании ряда векторов для трансформации растений с учетом различных особенностей процесса трансформации под действием агробактерий. В начале 80-х годов многие группы исследователей модифицировали Ti-плазмиды таким образом, чтобы удалить все онкогены Т-ДНК. При этом было обнаружено, что кодируемые Ti-плазмидой онкогены не участвуют ни в переносе Т-ДНК в растительную клетку, ни в ее интеграции с ядерной ДНК. Следовательно, эти гены можно заменить, встроив вместо них чужеродную ДНК. При этом плазида теряет онкогенные свойства. Следует, однако, отметить, что *nos*- или *ocs*-гены представляют собой удобные маркеры для трансформации, поскольку ферментативную активность их продуктов легко тестировать. До настоящего времени не сообщалось о возможных ограничениях размера вставки. Важную роль в данной области исследований сыграло и открытие того факта, что продукты *vir*-генов способны функционировать в *транс*-положении. Наконец, неонкогенные Т-ДНК, присутствующие в регенерированных целых растениях, передаются в потомстве согласно законам Менделя.

1.1.6. Основные компоненты неонкогенных Ti-плазмидных векторов

Принимая во внимание характер переноса генов, осуществляемого агробактериями, любую клонированную чужеродную ДНК можно перенести в геном клетки двудольного растения. Чужеродная ДНК, которую собираются перенести, должна быть фланкирована концевыми последовательностями Т-ДНК и стабильно поддерживаться в штамме агробактерии, несущем полный набор *vir*-генов в *цис*- либо *транс*-положении (т. е. локализующихся на отдельной плазмиде — помощнике вирулентности или «хелперной» плазмиде). Здесь следует отметить, что были описаны и хромосомные гены агробактерий, связанные с вирулентностью. Считается, что их продукты участвуют в узнавании бактерией поверхностных компонентов растительной клетки и последующем прикреплении.

Потеря онкогенных свойств означает, что в этом случае трансформированные ткани невозможно идентифицировать как неопластические выросты, клетки которых легко селективировать по их способности к росту на среде, не содержащей фитогормонов. Для разрешения проблемы идентификации трансформированных клеток между повторами длиной 25 п. н. встраивают бактериальные гены устойчивости к антибиотикам, помещенные под контроль промоторов Т-ДНК и снабженные сигналами полиаденилирования. Такие химерные гены устойчивости к антибиотикам эффективно экспрессируются в растительных клетках как доминантные признаки в любом генетическом окружении. Удобно, чтобы маркерные гены были тесно сцеплены с чужеродной ДНК по двум причинам. Во-первых, это позволяет осуществлять прямую селекцию трансформированной ткани растения, чтобы убедиться в переносе чужеродной ДНК. И во-вторых, это гарантирует, что фланкирующая чужеродная ДНК в конкретном трансформированном клоне, полученном в результате селекции, не была встроена в нетранскрибируемую область генома.

1.1.7. Неонкогенные векторы общего назначения на основе Ti-плазмид, используемые для трансформации растений

Для переноса чужеродной ДНК в растения использовались как *A. tumefaciens*, так и *A. rhizogenes*. Относительно генетических функций Ri-плазмид известно гораздо меньше, и поэтому векторы для трансформации, сконструированные на их основе, будут обсуждаться отдельно (разд. 1.1.8). На основе Ti-плазмид разработаны многочисленные трансформирующие векторы общего назначения (примеры приведены в табл. 1.1 и 1.2). Эти

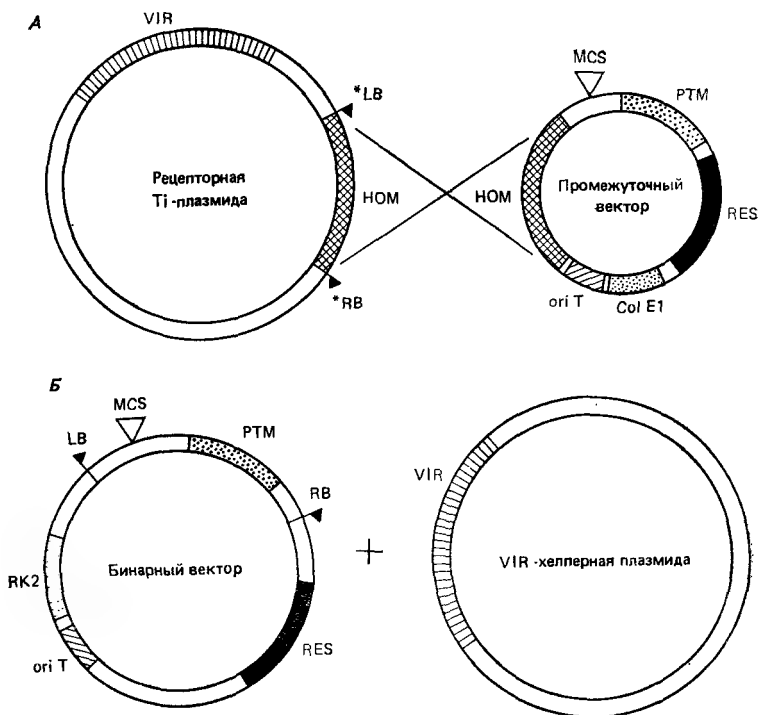


Рис. 1.3. Схематическая диаграмма обобщенных контегративной (А) и бинарной (Б) векторных систем. VIR — область вирулентности, HOM — области гомологии, в пределах которых может происходить рекомбинация, приводящая к образованию контегрантов. LB и RB — левая и правая границы (в промежуточном векторе могут присутствовать как LB, так и RB либо обе границы, см. текст), MCS — множественный (полилинкерный) сайт для клонирования, PTM — маркер для трансформации растений, RES — маркер устойчивости к антибиотику для селекции на присутствие последовательностей вектора в бактерии-хозяине, ori T — начало переноса и *bot*-сайт для мобилизации векторов при конъюгации, ColE1 — начало репликации из плазмиды ColE1, RK2 — начало репликации из плазмиды RK2 с широким кругом хозяев.

векторы не содержат каких-либо онкогенных последовательностей, и, следовательно, после переноса с их помощью ДНК в ядро растительной клетки нормальный рост растения не нарушается. Используемые обычно неонкогенные векторы можно разделить на два типа — *цис* или *транс*, в зависимости от того, находится ли область T-ДНК, фланкированная прямыми повторами длиной 25 п.н., на том же репликоне, что и *vir*-гены, или на отдельной плазмиде (рис. 1.3). В первом случае (*цис*-действующие *vir*-гены) вектор часто именуют контегративным, а во втором случае, при использовании *транс*-действующих *vir*-генов, его называют бинарным вектором.

Таблица 1.1. Примеры Ti-плазмидных векторов коинтегративного типа

Клонирующий (промежуточный) вектор (размер)	Vir-плазмида хозяина для коинтеграции	Область гомологии	Начало репликации, ori	Плазмиды-помощники, Mob/Tra
pMON200 ¹⁾ (9,5 т. п. н.)	pTiB6S3-SE ¹⁾ (GV3111)	LIH	pBR322 (Col E1)	pR64drdl1 pGJ23 (JM101)
pMON273 ²⁾ (10 т. п. н.)	pTiB6S3-SE (GV3111)	LIH	pBR322	JM101
pMON316 ²⁾ (11 т. п. н.)	pTiB6S3-SE (GV3111)	LIH	pBR322	JM101
pGV1103 ³⁾ (6,5 т. п. н.)	pGV3850 ⁴⁾ (C58C1)	Ген Ap ^r	pBR322	JM101
pGV831 ⁵⁾ (8,9 т. п. н.)	pGV2260 ⁵⁾ (C58C1)	Ген Ap ^r	pBR322	JM101

¹⁾ [21]; ²⁾ [44]; ³⁾ [26]; ⁴⁾ [61]; ⁵⁾ [15]. ⁶⁾ pMON316 — удобный вектор для экспрессии.

1.1.7.1. Цис-векторы

Векторы этого типа представляют собой производные Ti-плазмид дикого типа, из которых онкогены Т-ДНК были удалены и в некоторых случаях заменены на особый фрагмент ДНК, имеющий область гомологии с небольшим клонирующим вектором, способным реплицироваться только в *E. coli*. Эта стратегия основана на коинтеграции в клетках *A. tumefaciens* между гомологичными областями на модифицированной Ti-плазмиде (*vir*-хелпере) и небольшом клонирующем (промежуточном) векторе *E. coli*, содержащем селективный маркерный ген, который предназначен для работы в растительных клетках, и уникальные сайты для встраивания чужеродной ДНК.

Промежуточный вектор, содержащий последовательности чужеродной ДНК, обычно вводят в *A. tumefaciens* путем конъю-

(цис-действующие *vir*-гены).

Бактериальный селективный маркер	Граница Т-ДНК	Растительный селективный маркер	Nos/ocs	Сайты для клонирования. Примечания
Sm/Sp	Rb(SEV) pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	Nos	Уникальные сайты <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>XbaI</i> , <i>XhoI</i>
Sm/Sp	Rb(SEV) pTiT37	CaMV35S- <i>npt-II</i>	Nos	Уникальный сайт <i>HindIII</i>
Sm/Sp	Rb(SEV) pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	Nos	Уникальные сайты <i>BglII</i> , <i>ClaI</i> , <i>KpnI</i> и <i>EcoRI</i> , локализующиеся между промотором CaMV-35S и Nos-сайтом присоединения poly (A) ⁶⁾
Km	Her	<i>nos-npt-II</i>	—	<i>EcoRI</i> Дуплицированная последовательность pBR322 между границами Т-ДНК
Sm/Sp	Rb/Lb pTiB6S3	<i>nos-npt-II</i>	Ocs	<i>BamHI</i> Дуплицированные последовательности pBR322 ие находятся между границами Т-ДНК

гации, а затем с помощью соответствующего метода селекции могут быть получены трансконъюганты, в которых в результате гомологичной рекомбинации чужеродная ДНК стабилизировалась в составе Т-ДНК (рис. 1.3, А).

У некоторых векторов, таких, как pGV3850 (рис. 1.4), обе границы Т-ДНК находятся на модифицированной Ti-плазмиде. У таких векторов, как pGV2260 [15], повторы длиной 25 п.н. находятся в промежуточном векторе, тогда как в pTiB6S3-SE (вектор «сращиваемых концов» — от англ. split-end vector, [21]) правая граница находится на промежуточном векторе, а левая граница Т-ДНК на *vir*-плазмиде. Независимо от исходных положений повторов длиной 25 п.н. конечный результат коинтеграции заключается в инсерции последовательностей чужеродной ДНК между концевыми повторами Т-ДНК в составе модифици-

Таблица 1.2. Примеры бинарных векторов (транс-действующие *vir*-гены)

Клонировующий вектор (размер)	Вирулентная плазмида-помощник	Начало репликации плазмиды с широким кругом хозяев	Штамм бактерии-хозяина	Бактериальный селективный маркер
pBin19 ¹⁾ (10 т. п. и.)	pAL4404 ²⁾ (делеционный мутант pTiAch5)	pRK 252 (получена из pRK2)	HB101/C58C1	Km
pAGS113 ³⁾ (16 т. п. н.)	pAL4404	pRK2	HB101/C58C1	Km
pAGS125 ³⁾ (17,6 т. п. н.)	pAL4404	pRK2	HB101/C58C1	Km, Tc
pARC8 ⁴⁾ (28 т. п. н.)	pRiA4 ⁷⁾	pRK2	HB101/A4	Tc, Ap ⁹⁾
Бинарный ⁵⁾ (17 т. п. н.)	pAL4404	pKT240 ⁸⁾	LE392/C58C1	Sm, Gm
pGA469 ⁶⁾ (10,8 т. п. и.)	pTiA6 pTiT37 pTiBo542	pTJS75 (получена из RK2)	K802/A136	Tc

¹⁾ [8]; ²⁾ [30]; ³⁾ [54]; ⁴⁾ [48];

⁷⁾ pARC8 может также функционировать с плазмидами-помощниками *A. tumefaciens*.

⁹⁾ Ген Ap^r между границами Т-ДНК может быть полезен для клонирования Т-ДНК

рованной Ti-плазмиды. Таким образом, в штаммах *A. tumefaciens*, содержащих эти конструкции, во время трансформации Т-ДНК переносится в геном растения в результате действия *vir*-области в положении *цис*.

В качестве более детального примера можно привести pGV3850 [61] — *цис*-вектор, в котором онкогены Ti-плазмиды нопаинового типа (C58) были заменены на pBR322 (рис. 1.4). Любую последовательность чужеродной ДНК, клонированную в pBR322, можно ввести в pGV3850 с помощью двухступенчатого переноса в агробактерии путем конъюгации и последующей рекомбинации. Для этого pBR322, содержащую ген, который переносят в растительную клетку, и маркер, обеспечивающий селекцию в агробактериях (ген устойчивости к канамицину или стрептомицину/спектиномицину), вводят в штамм *E. coli* (GJ28), несущий две плазмиды-помощника, pGJ28 и pR64drd11. Эти плазмиды осуществляют хелперные функции по отношению к ColE1, и в результате все три плазмиды передаются агробакте-

Плазмиды-помощники, Mob/Tra	Граница Т-ДНК	Растительный селективный маркер	Nos/Ocs	Сайты для клонирования. Примечания
pRK2013 (HB101)	Rb/Lb pTiT37	pos-npt-II	—	Уникальные сайты <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>SstI</i> , <i>SmaI</i> , <i>XbaI</i> и <i>SalI</i> Скрининг на ИПТГ+ +X-GAL
pRK2013 (HB101)	Rb/Lb pTiA6/Ach5	pos-npt-II	—	<i>ClaI</i> , <i>BamHI</i>
pRK2013 (HB101)	Rb/Lb pTiA6/Ach5	pos-npt-II	—	<i>ClaI</i> , <i>BamHI</i>
pRK2013 (HB101)	Rb/Lb pTiT37	pos-npt-II	—	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>
pRK2013 (mm294)	Rb/Lb pTiT37	pos-npt-II	Nos	<i>EcoRI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SmaI</i> , <i>XbaI</i> , <i>SalI</i>
pRK2013	Rb/Lb pTiT37	pos-npt-II	—	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i>

⁵⁾ [40]; ⁶⁾ [4].

⁸⁾ Репликон pKT240 стабилен в агробактериях без селекцин. путем спасения плазмиды.

риям при конъюгации. Однако pBR322 не способна к репликации в агробактериях и, следовательно, не будет сохраняться. Тем не менее между pBR322 и pGV3850 может произойти рекомбинация, которая приведет к переносу последовательности представляющего интерес гена в Ti-плазмиду. Селекцию трансконъюгантов можно осуществить по устойчивости, кодируемой плазмидой, и устойчивости к рифампицину, которая кодируется хромосомой агробактерий. Затем с помощью гибридизации по Саузерну проводят тонкое картирование вставки в pGV3850.

1.1.7.2. Транс-векторы

Транс- или бимарные векторы конструируются на основе плазмид, содержащих последовательности границ Т-ДНК и способных реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях (рис. 1.3, Б). Эти векторы могут быть устроены таким образом, чтобы последовательности границ фланкировали множественные

сайты для клонирования, позволяющие осуществить инсерцию чужеродной ДНК, и маркеры, обеспечивающие прямую селекцию трансформированных растительных клеток. С плазмидами можно манипулировать в *E. coli*, а затем переносить их путем конъюгации в штаммы агробактерий, содержащие Ti-плазмиду, которая несет *vir*-область, но не имеет Т-ДНК и повторов длиной 25 п.н. Такие плазмиды часто представляют собой просто делеционные мутанты октопиновых или нопалиновых Ti-плазмид

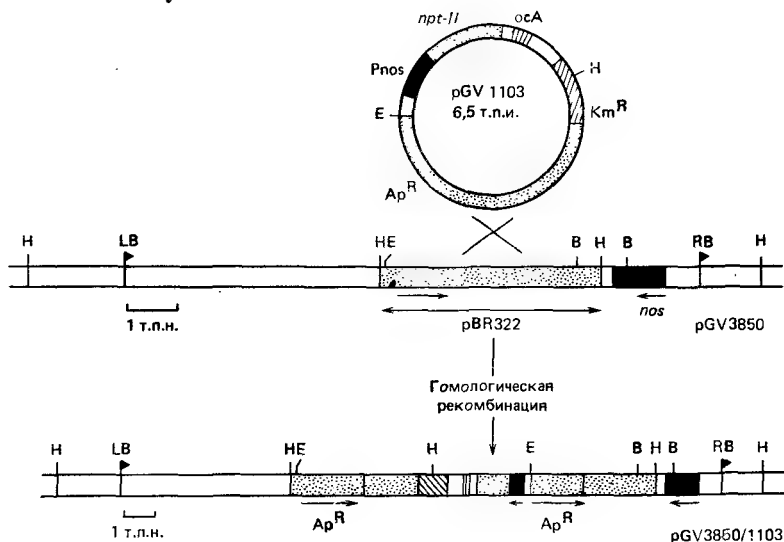


Рис. 1.4. Структура и использование коинтеграционного вектора pGV3850. Карты, показывающие структуры вектора для трансформации растений pGV3850 и промежуточного вектора pGV1103, и возможный результат образования коинтегранта pGV1103 с pGV3850. LB, RB — левая и правая границы, *P_{nos}* — промотор гена иопалинсинтазы, *npt-II* — кодирующая последовательность неомидин-фосфотрансферазы II из Tn5, *osA* — сигнал полиаденилирования гена октопинсинтазы; точками обозначены области (происходящие из последовательности pBR322) гомологии между вектором для трансформации растений и промежуточным вектором, *E* — *EcoRI*, *H* — *HindIII* и *B* — *BamHI* — сайты узнавания соответствующими рестриктазами, *nos* — ген иопалинсинтазы, *Ap^R* и *Km^R* — гены резистентности к ампициллину и канамицину.

дикого типа (табл. 1.2). Перенос чужеродной ДНК из клонирующего вектора в растительную клетку может опосредоваться *vir*-областью, функционирующей в *транс*-положении.

Широко используемый бинарный вектор pBin 19 получен на основе репликона pRK252 с широким кругом хозяев (рис. 1.5, А). Поэтому он способен реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях, что позволяет осуществить инсерцию чужеродной ДНК в вектор с последующим скринингом в клетках *E. coli*

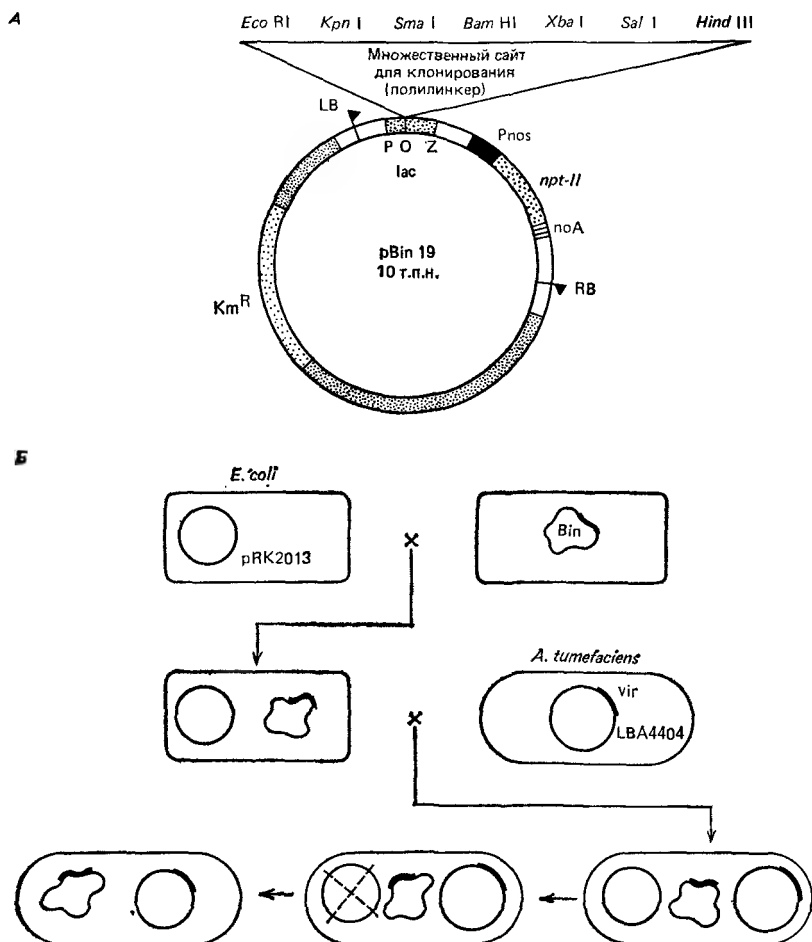


Рис. 1.5. Структура и использование бинарного вектора pBin19.

А. Карта бинарного вектора pBin19. LB, RB — левая и правая границы, lac — α -комплементарная область lac оперона, P_{nos} — промотор гена иопалинсинтазы, npt-II — кодирующая последовательность неомифинфосфотрансферазы II из Tn5, poA — сайт полиаденилирования гена иопалинсинтазы; точками обозначены последовательности плазмиды pRK252, содержащие начало репликации

Б. Мобилизация pBin19 в *A. tumefaciens* LBA4404 с помощью плазмиды-помощника pRK2013 и последующая элиминация хелперной плазмиды в агробактериях.

до переноса всей конструкции в агробактерии. Вектор содержит маркер устойчивости к канамицину (Km^r) для прямой селекции в бактериях, а также последовательности границ Т-ДНК, фланкирующие доминантный селективный маркер для использования в клетках растений (ген устойчивости к канамицину, фланкированный *nos*-промотором и сигналом полиаденилирования) и множественный сайт для клонирования в области α -комплементации β -галактозидазы. Скрининг рекомбинантов можно осуществлять в *Lac*⁻ штаммах *E. coli* путем α -комплементации в присутствии изопропилтио- β -D-галактозида (ИПТГ) и 5-бром-4-хлор-3-индол- β -D-галактозида (X-GAL) [24]. Вектор можно мобилизовать в агробактерии путем конъюгации с помощью плазмиды pRK2013. Реципиентный штамм *Agrobacterium* LBA4404 содержит Ti-плазмиду (pAL4404), у которой Т-ДНК была делетирована, но сохранена интактная *vir*-область. Для селекции транс-конъюгантов, содержащих pBin19, можно использовать устойчивость к канамицину и рифампицину.

Примеры векторных систем, имеющих *транс*-действующие *vir*-гены, представлены в табл. 1.2. Эти бинарные векторы варьируют по размерам, стабильности репликации в агробактериях, наличию рестрикционных сайтов для встраивания чужеродной ДНК, возможности использования X-GAL для скрининга рекомбинантных плазмид путем α -комплементации, наличию маркерных генов для селекции трансформированных растений и селекции транс-конъюгантов. Известно, что большинство этих плазмид совместимо с различными *vir*-плазмидами-помощниками *A. tumefaciens*, а многие совместимы и с Ri-плазмидами.

1.1.8. Векторы для трансформации растений с помощью *A. rhizogenes*

Первоначально такие векторы использовались для трансформации в тех случаях, когда трудно регенерировать целые растения из отдельных клеток. Растения многих видов могут регенерировать из культуры корней, индуцированных *A. rhizogenes*, путем соматического эмбриогенеза или органогенеза. Механизм, с помощью которого подавляется фенотип косматых корней (что обуславливает возможность морфогенеза побегов), до конца не выяснен. Регенерированные из косматых корней растения часто морфологически изменены, характеризуются складчатостью листьев, плагитотропной корневой системой, низкорослостью и низкой фертильностью [52].

1.1.8.1. Цис-векторы

Сконструирован промежуточный вектор, который позволяет проводить необходимые манипуляции в *E. coli* и содержит область Т-ДНК из Ri-плазмиды. Введение этого вектора в клетки

A. rhizogenes, несущие нормальную Ri-плазмиду, приводит к стабилизации последовательностей промежуточного вектора в результате внутримолекулярной гомологичной рекомбинации в Ri-плазмиде [32].

1.1.8.2. Транс-векторы

«Разоруженные» бинарные векторы, полученные на основе *A. tumefaciens* [8, 54], можно вводить в штаммы *A. rhizogenes*, где они будут стабильно реплицироваться в селективных условиях. Последующая инфекция растения штаммом *A. rhizogenes*, несущим бинарный вектор, вызовет перенос в геном растения не только Т-ДНК *A. rhizogenes*, но также и Т-ДНК бинарного вектора [46, 48]. Переносимые в растительный геном гены локализируются между последовательностями границ Т-ДНК бинарного вектора, которые функционируют в транс-положении после индукции *vir*-области резидентной Ri-плазмиды дикого типа [48, 51, 53]. Это может быть обусловлено высокой степенью гомологии на уровне ДНК между областями вирулентности *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* [31].

Недавно были индуцированы косматые корни у томата и огурца с помощью штамма *A. rhizogenes* дикого типа, содержащего бинарный вектор с селективным маркером Km^r. Среди регенерантов из этих устойчивых к канамицину линий косматого корня проводили скрининг растений с нормальным фенотипом. Было найдено несколько таких растений, которые утратили Т-ДНК *A. rhizogenes*, но сохранили Т-ДНК бинарного вектора [46, 53], предположительно, благодаря независимому переносу отдельных Т-ДНК. Если бы этот процесс можно было распространить на большее число культурных растений, то *A. rhizogenes* была бы весьма перспективна в качестве вектора трансформации.

1.1.9. Использование специальных трансформирующих векторов на основе Ti-плазмид

Приведенный в табл. 1.1 и 1.2 перечень векторов ни в коей мере не является исчерпывающим, однако он дает представление о диапазоне свойств векторов для трансформации общего типа. В то же время существуют разнообразные векторы трансформации растений, предназначенные для специальных целей (рис. 1.6).

Векторы экспрессии содержат сайты для клонирования, позволяющие легко использовать промоторы вектора, которые работают в растительных клетках и обеспечивают транскрипцию клонированных генов. Такие векторы используются для изуче-

ния продуктов считывания эукариотических кДНК, бактериальных генов или мутантных кодирующих последовательностей высших растений. К таким векторам относятся рАР2034 [56], рMON316 [44], рA10C3 [9].

Аналогично этому были разработаны векторы, содержащие беспромоторные индикаторные гены с множественным линкером в 5'-области для встраивания промоторных последовательностей; в качестве примера можно привести вектор для тестирования промоторов рGA482, который был описан в 1986 г. [3].

Космидные векторы содержат вне области Т-ДНК *cos*-сайт фага λ , что обеспечивает упаковку растительных трансформирующих векторов, несущих большие вставки ДНК. Векторы этого типа включают рAGS127 [54] и многие векторы из семейства рCV001-311, описанного Кончем и Шеллом [36].

Векторы спасения плазмид и космид содержат между границами Т-ДНК бактериальные гены устойчивости к антибиотикам и/или область начала репликации *E. coli* или *cos*-сайт λ ; они облегчают клонирование фланкирующих последовательностей в местах интеграции Т-ДНК с помощью методов спасения плазмид или космид. К таким векторам можно отнести рGV3850 [61], рEND4K [34] и рGA471 [4]; они удобны для клонирования генов с помощью подхода, основанного на инсерционном мутагенезе, и для изучения влияния положения генов в геноме на их экспрессию. К другому типу векторов этой категории относится рC22, который можно использовать для конструирования геномных библиотек в *E. coli* с целью переноса в агробактерии, а затем в большую популяцию растительных клеток. В настоящее время предприняты попытки использовать этот вектор для клонирования генов высших растений с помощью генетической комплементации [47].

Векторы «маркирования генов» вблизи правой границы Т-ДНК содержат лишённые промотора селектируемые маркерные гены. Случайная интеграция такой Т-ДНК рядом с геномной последовательностью, обладающей промоторной активностью, восстанавливает активность маркерного гена, что позволяет селектировать трансформанты данного типа на среде, содержащей антибиотики. Поэтому такие векторы полезны для клонирования последовательностей, обладающих промоторной активностью [5].

1.1.10. Выбор Ti-плазмидной векторной системы агробактерий

Выбор векторной системы для конкретного эксперимента по трансформации зависит от многих факторов, среди которых далеко не последними можно считать цель эксперимента и используемые виды растений. Из предыдущего раздела очевидно, что

векторы могут быть предназначены для осуществления специальных функций. Однако важно осознавать, что ни одна из векторных систем не может быть использована во всех случаях; это прежде всего относится к кругу хозяев, поскольку многие векторы первоначально тестировали только в системах трансформации модельных растений, чаще всего табака или петунии и различных видов пасленовых. Рассмотрим некоторые свойства обычных трансформирующих векторов, которые необходимо учитывать при разработке системы генетической трансформации новых растений.

1.1.10.1. Векторы *цис*-типа по сравнению с векторами *транс*-типа, конъюгация и стабильность плазмид

Промежуточные векторные компоненты коинтегративных векторов (*цис*-типа) и современные бинарные векторы сходны по размерам (6,5—28 т. п. н.) и обычно легко выделяются из *E. coli*. Таким образом, все манипуляции с рекомбинантными ДНК без каких-либо проблем можно осуществлять в *E. coli*. Мобилизация таких векторов в агробактерии обычно не составляет труда, но существуют различия в частоте мобилизации в зависимости от выбора вектора [36]. Системы конъюгационного переноса клонирующих векторов между *E. coli* и агробактериями специфичны для данного трансформирующего вектора растений, подробно они обсуждаются в разделе 1.10. Следует также отметить, что помимо эффективности мобилизации частота селекции трансконъюгантов в агробактериях гораздо выше для бинарных векторов, поскольку отпадает необходимость образования коинтегрантов (рис. 1.3). Кроме того, бинарный вектор легко перенести путем конъюгации и стабилизировать в любом новом штамме агробактерий, если возникает необходимость получить комбинацию вектора с различными *vir*-системами, новым хромосомным окружением или другими детерминантами бактериальной продукции фитогормонов. Чтобы достигнуть того же результата с коинтегративными векторами, часто приходится заново конструировать рецепторную плазмиду-помощник *vir*-функций.

К настоящему времени наиболее удобные (в отношении размера репликаона) функции репликации в широком круге хозяев, позволяющие бинарным векторам стабильно сохраняться при наличии селекции в агробактериях, происходят из плазмиды pRK252. Репликон pKT240 также не слишком велик, функционирует как в агробактериях, так и в *E. coli* и, как утверждают, стабилен в отсутствие селекции [40].

Часто в агробактериях обнаруживается несколько копий бинарных векторов, тогда как векторы *цис*-типа обычно присут-

ствуют в одной копии. Влияние этих различий на эффективность трансформации, копияность вставок Т-ДНК или организацию Т-ДНК в трансформированных растительных клетках окончательно не доказано.

1.1.10.2. *Vir*-гены, повторы длиной 25 п. н. и круг растений-хозяев

Уже довольно давно известно, что некоторые штаммы агробактерий дикого типа более вирулентны по отношению к одним видам двудольных растений, чем к другим (см., например, [12]). Полагают, что этот эффект практически не имеет отношения к онкогенности используемой Т-ДНК, а наоборот, зависит от эффективности конкретных *vir*-генов в процессе переноса Т-ДНК, функции участков Ti-плазмиды вне *vir*-областей и районов Т-ДНК, которые усиливают процесс переноса, а также от собственной бактериальной хромосомы используемого штамма агробактерий. Это ограничение круга хозяев очевидно и в том случае, когда для переноса Т-ДНК неонкогенных векторов используются *vir*-гены одной и той же Ti-плазмиды дикого типа.

Vir-системы

Насколько известно, все системы *vir*-генов широкого круга хозяев способны узнавать повторы длиной 25 п. н., фланкирующие области Т-ДНК Ti- и Ri-плазмид, и обеспечивать вырезание Т-ДНК и ее перенос в геном растения [30, 34, 48]. Однако, хотя системы вирулентности различных штаммов агробактерий проявляют общие функции, они не идентичны, и некоторые из них могут обеспечивать более эффективную трансформацию одних видов растений, чем других [12, 20]. В табл. 1.1 и 1.2 приведены общие *vir*-системы, используемые в сочетании с неонкогенными трансформирующими векторами растений. Вообще в большинстве бинарных векторных систем используют плазмиду октопинового типа (pTiAch5), у которой deletированы Т-ДНК и повторы длиной 25 п. н. (pAL4404). Рецепторные коинтегративные плазмиды pTiB6S3-SE и pGV2260 получены из Ti-плазмиды октопинового типа pTi86S3, а плазида нопалинового типа pTiC58 послужила основой для конструирования pGV3850. Таким образом, трудности получения трансформантов при использовании бинарных векторов в LBA4404 во многих случаях могут отражать ограничения *vir*-функций pAL4404.

Недавно было показано, что из растительных тканей можно регенерировать нормальные трансформированные побеги, утратившие онкогены Т-ДНК, если для обеспечения хелперных *vir*-функций использовать штаммы *A. tumefaciens* [20] и *A. rhizogenes* [46, 53] дикого типа в сочетании с неонкогенными бинарными векторами, несущими доминантные маркерные гены. Из

этих данных следует, что Т-ДНК бинарного вектора может переноситься в некоторые клетки независимо от Т-ДНК Ri- или Ti-плазмиды. Недавно была описана супервирулентная Ti-плазида (pTiBo542), обнаруженная в штамме *A. tumefaciens* дикого типа A281 [35]. По сравнению с другими штаммами *A. tumefaciens* A281 индуцирует большие, быстро развивающиеся опухоли у более широкого круга растений-хозяев. При использовании этой плазмиды дикого типа в качестве *vir*-помощника эффективность трансформации по сравнению с другими *vir*-системами возрастает по крайней мере втрое [2, 4]. Использование «супервирулентных» Ti- и Ri-плазмид дикого типа в будущем может сыграть важную роль в разработке систем трансформации культурных растений.

Усилители переноса Т-ДНК

Сообщалось, что в плазмиде дикого типа pTiA6NC особая последовательность, примыкающая к повтору длиной 25 п. н. на правом конце (получившая название «усилитель переноса» от англ. overdrive), усиливает перенос Т-ДНК [43]. В аналогичных районах нопалиновых Ti- (pTiT37) и Ri-плазмид (pRiA4) тоже были найдены последовательности ДНК с почти идентичной центральной частью (TGTTTGTT). Таким образом, важно выяснить, соседствует ли подобная последовательность с правой границей Т-ДНК в используемом векторе.

Роль собственной хромосомы агробактерий

Следует принимать во внимание и генетический фон хозяйского штамма агробактерий, поскольку в бактериальной хромосоме локализованы некоторые *vir*-функции, связанные главным образом с узнаванием поверхности растительной клетки и прикреплением к ней [19, 25]. Штаммы агробактерий различаются по скорости роста, продукции полисахаридов и общей токсичности для растительных клеток; все это может влиять на эффективность трансформации *in vitro*.

Производство фитогормонов агробактериями

Уже несколько лет известно, что штаммы агробактерий секретируют как ауксины (индолилуксусную кислоту, ИУК), так и цитокинины (*транс*-зеатин) и что подобная активность может создавать локальное гормональное окружение, оказывающее физиологическое влияние на клетки растения в отношении их компетентности для трансформации, скорости роста трансформированных клеток и проявлений морфогенеза. Например, в нопалиновых штаммах обнаружен локус (*tzs*), расположенный с внешней стороны рядом с границей *vir*-области, который кодирует фермент, отвечающий за конститутивную продукцию бактерией

транс-зеатина [7]. Недавно было показано, что инокуляция онкогенного нопалинового штамма дикого типа С58 (pTiC58) усиливает регенерацию эксплантатов листа *Populus* по сравнению с контролем. Подобный эффект не обнаруживается при инокуляции в те же эксплантаты октопинового штамма LBA4404, несущего хромосому Ach5 [20].

Таким образом, при работе с отдельными видами растений или даже сортами одного и того же вида следует иметь в виду, что трансформирующий вектор может быть более эффективен, если он направляется определенной *vir*-областью в сочетании с определенным хромосомным окружением. Оптимальные комбинации *vir*-систем, функций усилителя вирулентности и хромосомного фона, которые максимально увеличивают эффективность переноса Т-ДНК, можно определить только эмпирически.

1.1.10.3. Селектируемые/скринируемые маркерные гены для идентификации трансформированных клеток растений

Селективные маркерные гены

Следует учитывать две основные особенности маркерных генов. Во-первых, их структуру (нуклеотидную последовательность), которая определяет такие факторы, как регуляция транскрипции (конститутивная экспрессия или включение под действием определенных внешних условий или стадии развития), скорость транскрипции, стабильность транскрипта и эффективность трансляции. Во-вторых, активность продукта данного гена, который, очевидно, отвечает за доминантную экспрессию подходящего селективного фенотипа. В большинстве обычных векторов трансформации в качестве селективных маркеров используют прокариотические ферменты устойчивости к антибиотикам, которые были адаптированы с помощью генно-инженерных методов для конститутивного синтеза в растительных клетках (табл. 2.1). В некоторых экспериментах в качестве доминантных маркеров успешно использовались ферменты, обеспечивающие защиту от гербицидов. Обычно добиваются слияния кодирующей последовательности фермента с промоторами, выделенными из Т-ДНК или генома вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК), на 5'-конце, а на 3'-конце — с сигналом полиаденилирования (тоже полученным, как правило, из какого-либо гена Т-ДНК). В качестве маркерных генов наиболее широко используют гены устойчивости к таким антибиотикам, как канамицин, G418 [8, 27], гигромицин [54] и блеомицин [28]. Недавно для трансформации растительных клеток в качестве доминантных маркеров были использованы гены, обеспечивающие устойчивость к гербицидам, таким, как глифосат [45]. Поскольку селективные маркерные гены нормально функционируют в трансформированных

растительных клетках и не влияют на манипуляции с рекомбинантными ДНК, более подробно использование таких маркерных генов обсуждается в гл. 2. Удобство того или иного селектирующего агента зависит от его способности создать селективное давление на используемые растительные ткани. Было показано, что устойчивость к канамицину представляет собой очень удобный маркер трансформации, и поэтому во всех описываемых в дальнейшем экспериментах по трансформации и манипуляциях с рекомбинантными ДНК использованы векторы, несущие ген Km^r .

Маркерные гены для скрининга

Маркерные гены для скрининга (табл. 2.1) входят в состав многих трансформирующих векторов по двум причинам. Во-первых, чтобы обеспечить независимое подтверждение трансформированного статуса тканей, растущих на среде, содержащей селектирующие антибиотики или гербициды. Во-вторых, в качестве основного средства идентификации трансформантов в условиях, когда частоты трансформации высоки, а трансформированные ткани, в основном, имеют клональное происхождение; примером могут служить трансформированные побеги и корни, а также колонии, полученные из протопластов, высеянных на чашку в условиях низкой плотности (последние обычно можно рассматривать, как возникшие из отдельных трансформированных клеток).

В случае скринируемых маркеров важным фактором является простота, стоимость и специфичность методов обнаружения. Доступные в настоящее время методы анализа наиболее часто используемых скринируемых маркеров (хлорамфениколацетилтрансферазы, октопин- и нопалинсинтазы, β -глюкуронидазы, β -галактозидазы и люциферазы) подробно обсуждаются в гл. 2 (табл. 2.1). В векторных системах на основе Ri -плазмид дикого типа в качестве маркера опухолевой трансформации клеток обычно используют продукцию агропина или маннопина.

1.1.10.4. Сайты для клонирования в векторах трансформации растений

В данной главе предполагается, что цель эксперимента заключается просто во встраивании гена, клонированного ранее в *E. coli*, в обычный вектор для трансформации растений; затем он должен быть перенесен с помощью конъюгации в агробактерии. В результате получают штамм, готовый для трансформации. Обычные методы рекомбинантных ДНК, бактериальной трансформации и конъюгации, выделения и анализа плазмид, как

правило, можно использовать для всех типов трансформирующих векторов растений.

Во многих трансформирующих векторах присутствуют только один или два удобных рестрикционных сайта для клонирования, тогда как другие более универсальны и содержат ряд удобных сайтов в полилинкере, иногда расположенном в области α -комплементации β -галактозидазы, что позволяет обнаружить трансформированные рекомбинантные бактериальные клоны на чашках с X-GAL/ИПТГ (табл. 1.1 и 1.2).

1.1.11. Клонирование в векторах для трансформации растений

Основные методы рекомбинантных ДНК, необходимые для инсерции генов в трансформирующие векторы растений, не отличаются от таковых, используемых в работе с малыми плазмидами любого другого типа, реплицирующимися в *E. coli*. Рестрикционный фрагмент ДНК, несущий нужный ген, с помощью лигирования встраивают либо в промежуточный вектор (используемый для образования контегранта с Ti-плазмидным вектором *cis*-типа), либо в бинарный вектор, а затем трансформируют подходящий хозяйский штамм *E. coli* с помощью стандартных методик.

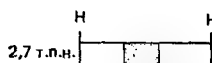
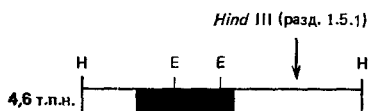
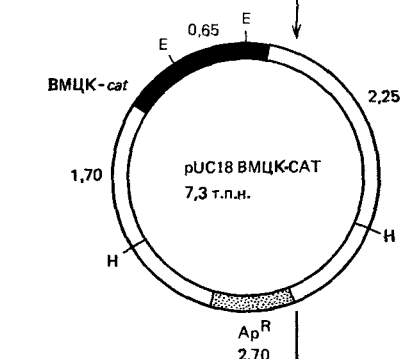
Цель данной главы заключается в том, чтобы дать некоторые простейшие указания, как осуществить инсерцию рестрикционного фрагмента ДНК в вектор для трансформации растений, и посвятить исследователя в основы технологии рекомбинантных ДНК. За более детальным разъяснением принципов клонирования генов и анализа последовательностей ДНК следует обратиться к литературным источникам, например [11, 39].

Для удобства описания методов рекомбинантных ДНК в этом разделе в качестве примера мы будем использовать бинарный вектор pBin19 (разд. 1.1.7.2 и рис. 1.5) [8]. Как пример контегративного вектора, мы будем использовать pGV3850 (разд. 1.1.7.1 и рис. 1.4) [61]. На рис. 1.7 представлена последовательная схема, описывающая различные этапы инсерции чужеродной ДНК в плазмиду pBin19.

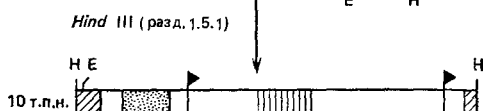
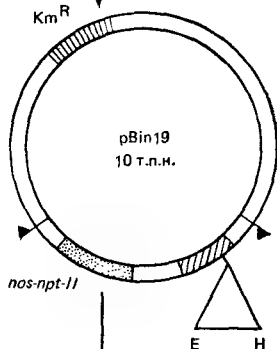
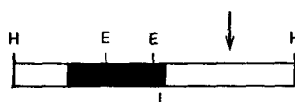
Методы, используемые для встраивания генов в pBin19, применимы ко многим другим трансформирующим векторам растений общего типа, за исключением, может быть, возможности скрининга на X-GAL/ИПТГ, которую дают не все векторы. Кроме очевидных различий в сайтах узнавания рестриктазами, используемыми для клонирования, и в маркерах устойчивости к антибиотикам, используемых для селекции трансформантов *E. coli* и агробактерий — трансконъюгантов, важно иметь в виду и присутствие в трансформирующем векторе растений последовательностей ДНК, необходимых для его мобилизации подхо-

Препаративное выделение плазмиды
в большом объеме (разд. 1.4)

Препаративное выделение плазмиды
в большом объеме (разд. 1.4)



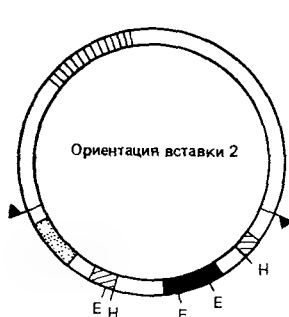
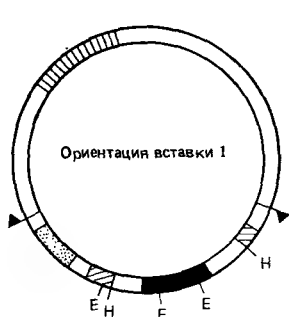
Электрофорез в агарозном геле (разд. 5.3)
Вырезают фрагмент длиной 4,6 т.л.н.
и извлекают из геля методом электроэлюции
(разд. 1.5.4)



Щелочная фосфатаза из
кишечника телянка
(разд. 1.5.3)



Лигируют (разд. 1.6), переносят в JM83
и отбирают белые колонии на NA + Km + X-GAL + ИПТГ
(разд. 1.7)



Характеризуют плазмиду с помощью рестрикционного анализа (разд. 1.9) мини-препарата
ДНК (разд. 1.8). Мобилизуют плазмиду в агробактерии в трехродительском скрещивании
(разд. 1.10) и проверяют конструкции тотальной ДНК агробактерий с помощью блоттинг-
гибридизации по Саузерну (гл. 5)

дшей плазмидой-помощником и переноса путем конъюгации (разд. 1.10). Для некоторых специальных векторов могут потребоваться другие варианты основных методик, и в этом случае читателю придется обратиться за подробностями к оригинальным публикациям (разд. 1.1.9). И наконец, в заключение следует сказать, что многие упомянутые в данном руководстве векторы для трансформации растений, селективируемые и скринируемые маркерные гены, штаммы-помощники *vir*-функций и конъюгации свободно доступны. Интересующимся исследователям следует обращаться за векторами и штаммами-помощниками непосредственно в лаборатории, в которых они были получены.

1.2. Общие молекулярно-биологические рекомендации

Для полной уверенности в том, что ферментативные реакции происходят предсказуемо и воспроизводимо, пробы не содержат примесей других, неспецифичных нуклеиновых кислот и нужные молекулы ДНК не деградируют во время манипуляций, необходим опыт практической работы. Источником значительных нуклеазных загрязнений может быть кожа рук и, следовательно, необходимо принимать меры предосторожности от возможного загрязнения. Ниже перечислены некоторые общие указания и методы, цель которых — по возможности свести к минимуму загрязнение нуклеазами, неспецифическими ДНК и посторонними веществами.

- Если растворы готовят и хранят в стеклянной посуде, то следует использовать пирекс, поскольку натриевое стекло содержит выщелачиваемые примеси.
- Стеклянные и пластиковые центрифужные пробирки следует вымыть хромпиком, замочить и вымыть щеткой в присутствии поверхностно-активного детергента, например Descon 90 (Descon Labs Ltd.), тщательно сполоснуть бидистиллированной водой, автоклавировать 15 мин при 121 °C и высушить перед использованием.
- Супернатанты после центрифугирования бактериальных культур сливают в специальную посуду, содержащую дезинфицирующее вещество (например, Nycolin, William Pearson Ltd.). При повторном использовании загрязненной пластиковой или стеклянной посуды перед мытьем ее следует замочить в дезинфицирующем растворе или автоклавировать. Все многократно используемые приспособления, загрязненные в про-

Рис. 1.7. Клонирование генов в pBin19. Схематическое изображение стратегии клонирования, позволяющего вставить *Hind*III-фрагмент (4,6 т. п. н.) *CaMV-cat* из pUC18CaMVCAT в *Hind*III-сайт плазмиды pBin19. *Н — дефосфорилированный *Hind*III-конец фрагмента ДНК. (ВМЦК тождественно *CaMV*.)

цессе контакта с суспензиями или экстрактами бактерий, перед повторным использованием следует простерилизовать.

- Все стекло, предназначенное для манипуляций в непосредственном контакте с РНК-содержащими растворами, перед использованием, кроме описанной выше процедуры мытья, следует силиконировать и прогреть в суховоздушном шкафу при температуре 180 °С в течение 2 ч.
- Одноразовые пластиковые наконечники и микроцентрифужные пробирки перед использованием необходимо автоклавируют, высушить и перенести в удобные штативы, используя при этом чистые одноразовые перчатки.
- В течение всего времени работать за столом следует в сменных перчатках.
- Для приготовления растворов следует использовать воду высокой чистоты, как минимум, деионизованную и дистиллированную.
- Для приготовления растворов необходимо использовать реактивы по крайней мере квалификации ХЧ (analytical grade).
- Во избежание перекрестных загрязнений и попадания РНКаз при взвешивании реактивов не следует пользоваться шпательями.
- Большинство растворов перед хранением автоклавируют; те растворы, которые необходимо стерилизовать фильтрованием, отмечены в тексте.
- Концентрированные растворы рестриктаз и других ферментов, модифицирующих ДНК, следует хранить при -20 °С, а непосредственно перед употреблением перенести в лед. Оставшиеся ферменты сразу же следует поместить в холодильник на -20 °С.
- Для уверенности в точности и воспроизводимости используют микродозаторы Gilson, регулярно проверяя их точность и меняя наконечники перед каждой операцией.
- Два часто используемых вещества, фенол и бромистый этидий, чрезвычайно опасны, их необходимо применять очень осторожно. Пятно фенола, покрывающее участок кожи размером в две ладони, может быть опасным для жизни, поэтому важно всегда иметь под рукой раствор ПЭГ 3000/этанол (7:3, вес на объем), которым необходимо сразу же обработать пораженную поверхность. Бромистый этидий является мутагеном и его контактов с кожей следует избегать.
- Радионуклиды следует приобретать и использовать согласно существующим санитарным нормам. Прежде чем планировать эксперименты с использованием радионуклидов, ознакомьтесь с правилами работы с открытыми радиоактивными источниками и включите в протокол соответствующие меры безопасности.

1.3. Культивирование и хранение бактериальных штаммов

Чтобы избежать получения неоднозначных результатов, чрезвычайно важно уметь надежно сохранять и вести селекцию специальных бактериальных штаммов (приложение 1 [II A]). Ниже описаны основные бактериологические методики конструирования рекомбинантных векторов для трансформации растений. Большинство бактериальных штаммов несет специфичные селективные маркеры, часто внехромосомные; сохранность маркеров следует регулярно тестировать, чтобы избежать возможной контаминации, мутации или утраты специфичных плазмид. Многие штаммы будут использоваться часто, тогда как другие от случая к случаю; таким образом, необходимы методы как быстрого размножения генетически чистых бактериальных колоний, используемых в качестве инокулята для засева культур больших объемов, так и длительного хранения важных штаммов. В приложении 1 [II B] приведены среды для селекции часто используемых бактериальных штаммов.

1.3.1. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Большинство наименований необходимого оборудования и приспособлений представлено в приложении 1 [I].
- Холодостойкие пробирки для хранения с закручивающимися крышками емкостью 2 мл (Sarstedt).
- Микрошпатель (по ширине меньший диаметра пробирок для хранения).
- Небольшой сосуд Дьюара для жидкого азота.

Растворы

- Питательный бульон (NB, Nutrient Broth, Oxoid); эту среду приготавливают согласно рекомендации изготовителя, автоклавируют и разливают в следующие емкости:
 - по 5 мл в стандартные пробирки для ночных культур,
 - по 80 мл в колбы емкостью 100 мл для культур небольшого объема,
 - по 400 мл во флаконы емкостью 500 мл для культур большого объема.
- Питательный агар (NA, Nutrient Agar, Oxoid); эту среду следует приготовить согласно рекомендациям изготовителя, довести до кипения для полного растворения, отмеренные объемы разлить по удобным для заливки чашек Петри емкостям и автоклавируют.

- Концентрированные растворы антибиотиков (см. приложение 1 [II B]).
- 40%-ный раствор глицерина в NB (автоклавировать).
- X-GAL: растворяют 5-бром-4-хлор-3-индол- β -D-галактопиранозид (BRL) в диметилформамиде в концентрации 40 мг/мл и хранят при -20°C .
- ИПТГ: растворяют изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (Pharmacia) в стерильной воде в концентрации 40 мг/мл и хранят при -20°C .

1.3.2. Нарращивание ночных бактериальных культур

1. С помощью раскаленной и охлажденной микробиологической петли (ее нагревают в пламени горелки до ярко-красного цвета, а затем дают остыть до комнатной температуры) переносят отдельную бактериальную колонию со свежей чашки, содержащей селективные антибиотики, в пробирку с 5 мл NB, содержащей те же антибиотики.
NB: соблюдайте стерильность!
2. а) *E. coli*: инкубируют 8—16 ч при 37°C с аэрацией, используя термостатируемую качалку с круговым вращением (амплитуда 5—10 см и скорость вращения 150—200 об/мин).
б) Агробактерии: наращивают 20—48 ч при 28°C с помощью аналогичной качалки.

1.3.3. Рассев бактериальных культур для получения отдельных колоний

1. Помещают стерилизованную в пламени горелки микробиологическую петлю в ночную культуру и проводят несколько штрихов по поверхности *подсушенной* агаризованной среды (с соответствующими селективными антибиотиками) в чашке Петри диаметром 9 см, как показано на рис. 1.8. Между проведением первого и второго штрихов проносят петлю через пламя.
2. Если возможно, слегка приоткрывают крышку чашки и подсушивают нанесенные штрихи в стерильном ламинарном боксе в течение 10 мин. Закрывают крышку, а затем помещают чашку в термостат в перевернутом положении (крышкой вниз) и инкубируют в тех же условиях температуры и времени, как указано в разд. 1.3.2.
3. Обматывают края чашки липкой лентой и оставляют при комнатной температуре, если собираются использовать в течение 2—3 дней, либо хранят при 4°C в течение месяца.

1.3.4. Длительное хранение бактериальных штаммов

1. Готовят ночную культуру штамма, предназначенного для хранения, как описано в разд. 1.3.2.
2. Смешивают 0,75 мл ночной культуры с 0,75 мл 40%-ного глицерина в питательной среде, помещают в холодостойкую пробирку для хранения с завинчивающейся крышкой емкостью 2 мл, делают соответствующую пометку на пробирке и быстро охлаждают, опустив в сосуд Дьюара с жидким азотом.
3. Хранят при -80°C . В этих условиях бактерии остаются жизнеспособными в течение 10 лет.
4. Для получения быстро растущих клеток из находящихся на хранении культур захватывают небольшую порцию замороженной смеси с помощью простерилизованного в пламени

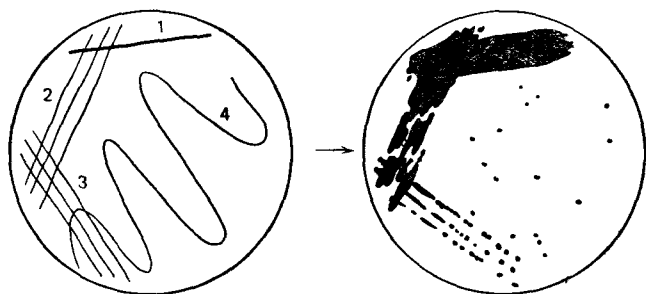


Рис. 1.8. Рассев бактерий на чашках для получения отдельных колоний. Штрихи наносят в указанном цифрами порядке. Петлю следует пронести через пламя горелки и охладить между штрихами (1) и (2).

микрошпателя и ресуспендируют в 5 мл NB. Высевают на чашку с агаризованной бактериальной средой, содержащей селективные антибиотики, как описано в разд. 1.3.3.

1.3.5. Приготовление чашек для селекции бактерий

Питательный агар необходимо расплавить путем нагревания на пару (например, в бытовой кастрюле-скороварке) или с помощью микроволновой печи и охладить до $45\text{--}55^{\circ}\text{C}$ (желательно в соответствующей водяной бане), прежде чем добавить антибиотики или другие термолabile компоненты. Чашки можно хранить при 4°C от нескольких дней до нескольких недель в зависимости от стабильности добавок (подробнее об антибиотиках см. приложение 1 [II]).

Кроме маркеров устойчивости к антибиотикам для селекции отдельных хромосомных признаков и поддержания специфических плазмид во многих современных клонирующих векторах используются комбинации окрашивающихся индикаторных суб-

стратов и индукторов (таких, как X-GAL и ИПТГ) для скрининга рекомбинантных трансформантов. Например, вектор для трансформации растений рBin19 (разд. 1.6) содержит полилинкерный сайт для встраивания ДНК в гене *lacZ*, и любая вставка в этот сайт нарушает продукцию функционального фермента β -галактозидазы. Поэтому трансформированные бактериальные колонии, несущие рекомбинантные плазмиды, не способны расщеплять хромогенные субстраты, такие, как X-GAL, и остаются белыми, тогда как бактериальные колонии, несущие плазмиды без вставок, имеют голубую окраску благодаря расщеплению X-GAL β -галактозидазой.

Таким образом, для скрининга β -галактозидазы добавляют к охлажденному NA X-GAL и ИПТГ в конечной концентрации 40 мкг/мл. Чашки с X-GAL/ИПТГ нестабильны и их следует готовить непосредственно перед использованием.

1.4. Препаративное выделение плазмид из *E. coli* в больших объемах

1.4.1. Основные положения

Выделение малых плазмид в больших количествах из *E. coli* — это важный этап любой серии манипуляций, имеющей целью встраивание генов в трансформирующие векторы растений. Плазмиды могут содержать ген, предназначенный для переноса, в специфичном рестрикционном фрагменте или могут быть частью векторной системы трансформации растений, например промежуточным вектором для коинтеграции с модифицированной плазмидой или бинарным вектором, способным реплицироваться в *E. coli* и агробактериях.

Представленная ниже методика выделения успешно использовалась для получения различных плазмид (в том числе рBin19, рBR322, рGV1103, рUC18) и представляет собой по существу крупномасштабный вариант минипрепаративной процедуры, разработанной Бирнбоймом и Доли [10]. Разделение хромосомной и плазмидной ДНК основано на наблюдении, что существует узкая область рН 12,0—12,5, в которой линейная хромосомная ДНК денатурирована, а ковалентно замкнутая кольцевая плазмидная ДНК — нет.

Клетки обрабатывают лизоцимом для ослабления клеточной стенки, а затем лизируют ДСН в присутствии NaOH. Отношение объемов суспензии клеток и щелочного ДСН имеет важное значение и должно строго соблюдаться, поскольку определяет конечное значение рН смеси. После нейтрализации хромосомная ДНК ренатурирует, образуя нерастворимый сгусток, тогда как плазмидная остается в растворе. Кроме того, высокая концент-

рация ацетата калия вызывает преципитацию ДСН-белковых комплексов и высокомолекулярной РНК. Плазмиду осаждают из супернатанта этанолом, а затем очищают путем центрифугирования в градиенте плотности. Грубый раствор ДНК смешивают с бромистым этидием (БЭ) и хлористым цезием (CsCl) и центрифугируют до установления равновесного градиента плотности CsCl . БЭ интеркалирует в ДНК и уменьшает ее плавучую плотность. Поскольку кольцевая ДНК менее способна раскручиваться, чем линейная, в плазмидные молекулы интеркалирует меньшее количество БЭ, и их плотность, следовательно, выше,



Рис. 1.9. Формирование зон плазмидной и хромосомной ДНК в градиенте плотности CsCl . В УФ свете сфотографирована центрифужная пробирка, в которой произошло разделение плазмидной и хромосомной ДНК после центрифугирования при 55 000 об/мин в течение 22 ч.

чем у линейной хромосомной ДНК. Хотя бактерии содержат кольцевые хромосомы, они слишком велики, чтобы выдержать процедуру выделения и остаться интактными, и, таким образом, в градиенте CsCl плазмидная ДНК локализуется в зоне, расположенной ниже зоны хромосомной ДНК (рис. 1.9). С помощью данного метода из 500 мл исходной культуры обычно получают 1—2 мг плазмидной ДНК, свободной от примесей РНК и гидролизующей рестрикционными ферментами.

Выделенная плазмидная ДНК представлена тремя формами, в зависимости от того: 1) являются ли обе цепи полностью ин-

тактными и сохранила ли плазмида свою первоначальную суперспирализованную, ковалентно замкнутую кольцевую конфигурацию (covalently closed circle — ccc), 2) получила ли одна из цепей разрыв («ник»), позволяющей плазмиде релаксировать и образовать открытое кольцо (open circle — oc), или 3) цепь ДНК была разорвана с образованием линейной молекулы (linear — l). Благодаря различной конфигурации эти три формы имеют неодинаковую электрофоретическую подвижность в агарозном геле (рис. 1.10, дорожка 3). Точное определение мол. массы возможно только в случае линейной ДНК, следовательно, для определения размера плазмиды перед электрофорезом ее необходимо перевести в линейную форму с помощью подходящей рестриктазы (рис. 1.10, дорожка 2).

1.4.1.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Среднескоростная центрифуга с охлаждением (например, Sorval RC-5B, Dupont (UK) Ltd.) с угловыми роторами на 6×250 мл и 8×50 мл.
- Полиалломерные центрифужные стаканы с полипропиленовыми закручивающимися крышками на 250 и 35 мл (например, соответствующие стаканы для высокоскоростных центрифуг Nalgene или LKB).
- Ультрацентрифуга (например, Beckman L7-65 или равноценная) с высокоскоростным угловым (например, Ti-80) или вертикальным (например, VTi-65) ротором.
- Полиалломерные центрифужные пробирки и устройство для запаивания пробирок.
- Силиконированные и автоклавированные центрифужные пробирки из корекса (Corning Medical).
- Спектрофотометр с УФ-диапазоном не менее чем от 200 до 300 нм (например, Perkin-Elmer Lambda 5 UVVIS Spectrophotometer).
- Небольшая пластиковая трубка, один конец которой заткнут стекловатой (Supra Aquatic Supplies Ltd.).
- Диализные трубки¹⁾.
- Хирургические зажимы (Scientific Industries International Inc. (UK) Ltd.).
- Одноразовый пластиковый шприц объемом 5 мл, снабженный иглой $0,4 \times 19$ см (Monoject Division).
- Ультрафиолетовая лампа (например, UV Product, модель UVGL-58), закрепленная в штативе.

- Темная комната.
- Емкость для сбора загрязненного раствора БЭ/CsCl.
- CsCl (BDH, квалификации для градиентного ультрацентрифугирования).

Растворы

- NB, содержащий соответствующие антибиотики:
5 мл в стандартных пробирках,
500 мл в 2-литровой конической колбе.
- 2М трис-HCl, pH 8,0 и 7,5. *На 1 л:* растворяют 242,2 г трис-основания в 800 мл дистиллированной H₂O и доводят pH концентрированной HCl. Используют специальный электрод для измерения pH в трис-буферах (Sigma). Доводят объем до 1 л дистиллированной H₂O. Эти растворы стабильны в течение нескольких месяцев при комнатной температуре.
- Лизирующий раствор (25 mM трис-HCl, pH 8,0; 10 mM ЭДТА; 0,5 M глюкоза; 1 мг/мл лизоцима). *На 100 мл:*
2 M трис-HCl, pH 8,0 1,25 мл
0,5 M ЭДТА 2,00 мл
Глюкоза 9,01 г
Лизоцим (Sigma Grade I) 0,10 г

Раствор необходимо приготовить без лизоцима, автоклавировать и хранить при комнатной температуре. Лизоцим добавляют непосредственно перед употреблением.

- Щелочной ДСН (0,2 M NaOH, 1% ДСН). *На 100 мл:*
10 M NaOH 2,0 мл
25%-ный ДСН 4,0 мл.

Раствор готовят непосредственно перед употреблением, добавляя компоненты к 94 мл дистиллированной H₂O.

- 3 M ацетат калия, pH 5,2: растворяют 117,78 г ацетата калия (BDH Analar) в 200 мл дистиллированной воды. Доводят pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой (BDH Analar), объем раствора — до 400 мл, автоклавируют и хранят при комнатной температуре.
- 2 M ацетат натрия, pH 5,6: растворяют 27,16 г ацетата натрия (BDH Analar, трехводный) в дистиллированной воде. Доводят pH до 5,6 ледяной уксусной кислотой (BDH Analar), объем раствора — до 100 мл, автоклавируют и хранят при комнатной температуре.
- ТЭ-буфер (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 7,5). *На 100 мл:*
2 M трис-HCl, pH 7,5 0,5 мл
0,5 M ЭДТА 0,2 мл.

Доводят до нужного объема дистиллированной H₂O, автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

- 10 mM трис-HCl, pH 7,5 (готовят из 2 M трис-HCl, pH 7,5, см. выше).

- Бромистый этидий (Sigma) (5 мг/мл в дистиллированной воде); хранят при 4°C в темноте. Этот раствор стабилен в течение нескольких месяцев.
- CsCl, насыщенный изопропанолом: перед употреблением заливают насыщенный раствор CsCl изопропанолом, энергично встряхивают до образования эмульсии, а затем дают фазам разделиться.
- Изопропанол (BDH Analar).
- Диэтиловый эфир (BDH Analar).

1.4.1.2. Методика (модифицирована по [10])

1. Засевают отдельную колонию нужного штамма *E. coli* в 5 мл NB, содержащего селективные антибиотики, и инкубируют при 37°C с аэрацией в течение ночи.
2. Инокулируют 50 мкл этой суспензии в 500 мл NB, содержащего селективные антибиотики, в 2-литровой колбе и инкубируют на качалке при 37°C в течение ночи.
3. Собирают клетки центрифугированием в двух стаканах по 250 мл при 8000 об/мин и 4°C в течение 5 мин, используя центрифугу Sorval RC-5B (или аналогичную).
4. Удаляют супернатант и тщательно ресуспендируют осадок в двух порциях по 20 мл лизирующего раствора, объединяют и инкубируют на льду в течение 5 мин.
5. Добавляют 80 мл щелочного ДСН, перемешивают и инкубируют 4 мин на льду.
6. Добавляют 60 мл 3 М ацетата калия (рН 5,2) и хорошо перемешивают.
7. Центрифугируют 10 мин при 8000 об/мин и 4°C и переносят супернатант в чистый центрифужный стакан на 250 мл, предварительно отфильтровав через пластиковую воронку со стекловатой.
8. Добавляют 100 мл изопропанола, хорошо перемешивают и центрифугируют 10 мин при 8000 об/мин и 4°C.
9. Осторожно промывают осадок 70%-ным этанолом, а затем эфиром и выпаривают эфир в вытяжном шкафу^{а)}.
10. Растворяют осадок в 10 мл ТЭ-буфера.
11. С помощью весов доводят объем до 17,5 г (если требуется, добавляют ТЭ-буфер), добавляют 20,79 г CsCl и 3,5 мл раствора БЭ. Конечная плотность раствора должна составлять примерно 1,55 г/мл.
12. Центрифугируют 15 мин при 15 000 об/мин и комнатной температуре в центрифужных пробирках емкостью 35 мл^{б)}.
13. Полностью заполняют пробирки для ротора Ti80 Beckman (или равноценного) подготовленным раствором ДНК^{в)} и запаивают отверстия пробирок.

14. Центрифугируют 22 ч при 55 000 об/мин и 15 °С.
15. Осторожно вынимают пробирки из ротора и осматривают их в темной комнате под УФ-светом. На этой стадии должны быть видны две зоны — верхняя, четкая зона хромосомной ДНК и нижняя, более диффузная зона плазмидной ДНК

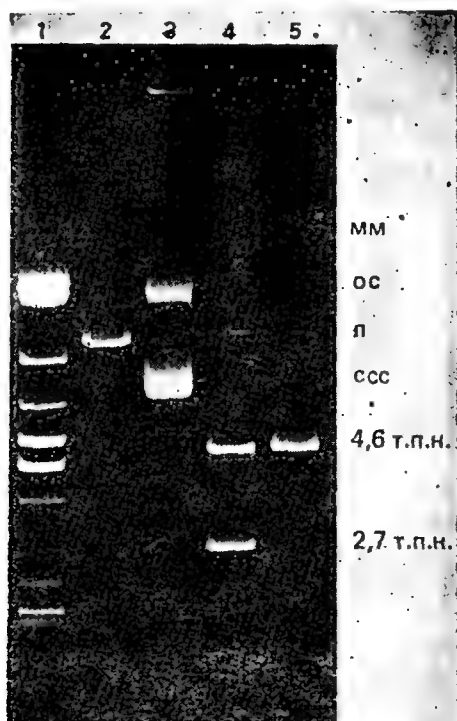


Рис. 1.10. Препаративное выделение фрагмента ДНК для лигирования. 1. Маркеры мол. массы (смесь фрагментов ДНК фага λ , расщепленной *Hind*III и *Hind*III+*Eco*RI). 2. *pBin*19, переведенная в линейную форму с помощью *Hind*III. 3. Неразрезанная ДНК *pBin*19 после очистки в градиенте плотности [ссс, л, ос и мм (мультимерные) формы плазмидной ДНК]. 4. *pUC18CaMVCAT* после расщепления *Hind*III: фрагменты длиной 4,6 и 2,7 т. п. н. 5. *CaMV-cat*-фрагмент длиной 4,6 т. п. н. после выделения из агарозы с помощью электро-элюции.

(рис. 1.10). Прокалывают верхнюю часть пробирки и, используя шприц и иглу, введенную через боковую стенку пробирки чуть ниже нижней зоны, собирают нижнюю зону в как можно меньшем объеме, и переносят содержимое в стерильную стандартную пробирку.

16. Удаляют полностью БЭ путем многократной экстракции нижней (водной) фазы равным объемом изопропанола, насыщенного CsCl и H₂O.
17. Переносят раствор плазмиды в приготовленный диализный мешок^Г), один конец которого пережат хирургическим зажимом, и пережимают другой конец аналогичным образом.
18. Диализуют против 2 л H₂O в течение 3 ч при 4 °С на магнитной мешалке, меняя H₂O через каждый час.
19. Переносят раствор плазмиды в подходящую емкость (например, силиконированную пробирку из корекса) и определяют концентрацию плазмиды^Д). Если концентрация ниже требуемой, необходимо переосадить плазмиду этанолом, как описано на стадиях 20—24.
20. Добавляют 0,1 объема 2 М ацетата натрия (рН 5,6) и перемешивают.
21. Добавляют 3 объема этанола, перемешивают и охлаждают в течение 15 мин в бане сухой лед/этанол.
22. Центрифугируют при 10 000 об/мин и комнатной температуре 15 мин.
23. Удаляют супернатант, промывают осадок 70%-ным этанолом и высушивают в вакууме.
24. Ресуспандируют в небольшом объеме 10 мМ трис-HCl (рН 7,5^Е), измеряют концентрацию^Д) и доводят до 0,5 мг/мл.

Примечания

- ^А) Эфир можно быстро удалить током N₂ с помощью пастеровской пипетки, соединенной гибким шлангом с каким-либо сосудом, подающим азот.
- ^Б) С помощью этого приема удаляется вся РНК и белок, которые выпали в осадок на предыдущей стадии.
- ^В) Если для полного заполнения пробирки не хватило градиентного материала, ее следует заполнить раствором CsCl плотности 1,55 г/мл.
- ^Г) Диализные трубки подготавливают к употреблению путем кипячения в 1%-ном Na₂CO₃ в течение 20 мин. Затем их вымачивают в течение 20 мин в 10 мМ ЭДТА при комнатной температуре, дважды промывают дистиллированной H₂O по 20 мин при комнатной температуре и, наконец, автоклавируют в дистиллированной H₂O.
- ^Д) Концентрацию ДНК можно определить либо путем сравнения с известным стандартом в агарозном геле, либо путем измерения OD₂₆₀ разведенной аликвоты раствора плазмиды. OD₂₆₀=1,0 соответствует концентрации ДНК 50 мкг/мл.
- ^Е) Если плазмиду не удается гидролизовать рестрикционными ферментами, ее можно дополнительно очистить с помощью экстракции смесью фенол/хлороформ между стадиями 19 и 20 следующим образом.
 - 1) Оценивают объем раствора плазмиды, добавляют равный объем смеси фенол/хлороформ (1:1) (см. разд. 1.5.2.1) и перемешивают до образования эмульсии путем встряхивания.
 - 2) Центрифугируют 5 мин при 8000 об/мин и переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку.
 - 3) Добавляют равный объем хлороформа и снова встряхивают.
 - 4) Центрифугируют 5 мин при 8000 об/мин и переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку.
 - 5) Осаждают этанолом и растворяют, как на стадиях 20—24.

1.5. Выделение и очистка рестрикционных фрагментов ДНК для лигирования

1.5.1. Основные положения

Подробности использования рестрикционных ферментов представлены в разд. 5.2. Полученные с помощью центрифугирования в градиенте плотности препараты плазмид обычно отличаются высокой чистотой и легко подвергаются гидролизу рестрикционными ферментами. Условия лигирования фрагментов ДНК будут зависеть от стратегии, выбранной для оптимизации выхода требуемых рекомбинантных молекул. Может возникнуть необходимость отделить специфичные фрагменты от продуктов рестрикционного гидролиза и/или дефосфорилировать популяцию фрагментов, чтобы предотвратить самолигирование; ниже представлены описания этих методик. Перед составлением смеси для лигирования из растворов ДНК необходимо удалить рестрикционные ферменты с помощью депротенинизации смесью фенол/хлороформ и осаждения этанолом. В разд. 1.6 обсуждаются факторы, которые необходимо учитывать при лигировании фрагментов ДНК с клонирующими векторами. Например, рBin19 необходимо разрезать *Hind*III и дефосфорилировать, тогда как рUC18CaMVCAТ необходимо разрезать *Hind*III, а затем очистить с помощью электрофореза CaMV-*cat*-фрагмент рUC18CaMVCAТ размером 4,6 т. п. н. На рис. 1.10 (дорожки 2, 4 и 5) показаны фрагменты ДНК, обнаруживаемые на различных стадиях препаративного выделения фрагмента.

1.5.2. Очистка фрагментов ДНК после гидролиза рестриктазами

1.5.2.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

Те же, что и в разд. 5.2.

Растворы

Те же, что и в разд. 5.2, с добавлением следующих:

- Смесь фенол/хлороформ (1:1). Смешивают в соотношении 1:1 фенол, насыщенный ТЭ-буфером (ТЭ-буфер, см. разд. 1.4.2), содержащий 0,1% 8-гидроксихинолина, и хлороформ, содержащий 4% изоамилового спирта. Смесь стабильна при 4°C в течение нескольких месяцев, ее нельзя использовать, если вместо нормального ярко-желтого цвета она приобрела коричневатый оттенок.
- 2 М ацетат натрия, рН 5,6 (разд. 1.4.2).
- 70%-ный этанол.
- Хлороформ (BDH Analar).

1.5.2.2. Методика

Проводят рестрикцию соответствующей плазмиды, как описано в разд. 5.2.

1. После полного завершения гидролиза доводят объем водой до 100 мкл.
2. Добавляют 100 мкл смеси фенол/хлороформ (1:1) и перемешивают энергичным встряхиванием.
3. Центрифугируют в микроцентрифуге при 12 000 об/мин 5 мин и переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку Эппендорф.
4. Добавляют 100 мкл хлороформа, хорошо перемешивают и центрифугируют 1 мин при 12 000 об/мин.
5. С помощью автоматической микропипетки Gilson отбирают нижнюю органическую фазу и удаляют.
6. Добавляют 10 мкл 2 М ацетата натрия (рН 5,6) и перемешивают.
7. Добавляют 330 мкл этанола и охлаждают на бане сухой лед/этанол в течение 15 мин.
8. Центрифугируют 15 мин при 12 000 об/мин и удаляют супернатант.
9. Добавляют 330 мкл 70%-ного этанола, перемешивают и снова центрифугируют 5 мин при 12 000 об/мин.
10. Удаляют супернатант, высушивают под вакуумом и ресуспендируют в соответствующем объеме H_2O перед использованием в реакции лигирования (разд. 1.6).

1.5.3. Удаление 5'-фосфатных групп фрагментов ДНК с помощью фосфатазы из кишечника телят

1.5.3.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

— Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).

Растворы

— 10×CIP (500 мМ трис-HCl, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА). На 10 мл:
 2 М трис-HCl, рН 8,0 (см. разд. 1.4.2) 2,50 мл
 0,5 М ЭДТА 0,02 мл

Доводят объем до необходимого дистиллированной H_2O .

— 30 мМ Na-нитрилотрехуксусная кислота. На 10 мл: растворяют 70,5 мг двуназиевой соли (Sigma) в 10 мл дистиллированной H_2O . Хранят при $-20^\circ C$.

— Фосфатаза из кишечника телят (Calf intestinal phosphatase, BRL, квалификации «для молекулярной биологии»), разведенная до требуемой активности буфером для хранения^{а)}.

1.5.3.2. Методика

1. Добавляют следующие компоненты в пробирку Эппендорф емкостью 1,5 мл:

Раствор ДНК (в H_2O)	1—17 мкл
$10\times$ СР	2 мкл
H_2O	до 19 мкл
Фосфатаза из кишечника теленка	1 мкл

2. Инкубируют 30 мин при $37^\circ C$.
3. Останавливают реакцию добавлением 10 мкл 30 мМ нитрилотриуксусной кислоты. Инкубируют 45 мин при $65^\circ C$.

Если обработанную фосфатазой ДНК необходимо непосредственно добавить в лигируемую смесь, то ее следует очистить, как описано в разд. 1.5.2. Если после обработки фосфатазой требуется выделить специфический фрагмент, то, остановив реакцию, смесь необходимо обработать так же, как после полного рестрикционного гидролиза согласно методикам, приведенным в разд. 1.5.4 или 1.5.5.

Примечание

- ^{a)} Для удаления 5'-концевых фосфатных групп 1 пмоль концов (в 1,6 мкг фрагмента размером 5 т. п. н. содержится 1 пмоль концов) требуется 0,05 ед. ферментативной активности. Важно, чтобы в реакции участвовало минимальное количество фермента, поскольку возможные примеси экзонуклеаз, присутствующие в небольших количествах в препаратах этого фермента, могут гидролизовать одноцепочечные липкие концы.

1.5.4. Электроэлюция рестрикционных фрагментов из агарозных гелей

1.5.4.1. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Оборудование для электрофореза в агарозном геле (разд. 5.3.2).
- Камера для электроэлюции (например, LKB, Extraphor).
- УФ-транслюминатор (например, UV Products, модель TS-36).
- Защитные очки и маска для работы с ультрафиолетом.
- Пинцет с тупыми концами.

Растворы

- Растворы для электрофореза в агарозном геле (разд. 5.3).
- Высосолевой буфер (3 М ацетата натрия, pH 7,9; 0,01% бромфенолового синего).

На 100 мл: растворяют 40,82 г трехводного ацетата натрия (BDH Analag) в 50 мл дистиллированной H_2O . Доводят pH до 7,9 ледяной уксусной кислотой (BDH Analag), добавляют 10 мг бромфенолового синего (Pharmacia) и доводят объем до 100 мл. Автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

— Буфер для электрофореза (10 мМ трис-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ NaCl). *На 1 л концентрированного десятикратного раствора:*

2 М трис-HCl, pH 8,0 (см. разд. 1.4.2)	50 мл
0,5 М ЭДТА	20 мл
5 М NaCl	1 мл
Дистиллированная H_2O	929 мл

Полученный раствор хранят как десятикратный исходный раствор при комнатной температуре и разводят до рабочей концентрации (в десять раз) непосредственно перед употреблением.

— Этанол ($-20^\circ C$).

— 70%-ный этанол.

— Стерильная дистиллированная H_2O .

1.5.4.2. Методика

1. С помощью электрофореза в агарозном геле фракционируют рестрицированную ДНК, как описано в разд. 5.3. Количество расщепленной ДНК и условия электрофореза необходимо подобрать таким образом, чтобы получить хорошее отделение нужного фрагмента от других фрагментов ДНК и достаточное его количество для последующего лигирования (разд. 1.6.1).
2. Помещают гель на УФ-трансиллюминатор и идентифицируют требуемую зону.
3. С помощью острого скальпеля вырезают нужные зоны (будьте осторожны, чтобы не повредить ультрафиолетовый фильтр) и переносят тонким пинцетом в стерильные пластиковые пробирки.
4. Подготавливают камеру для электроэлюции согласно инструкции изготовителя.
5. Разрезают фрагмент(ы) геля на небольшие кусочки (кубики 1—3 мм) и помещают в круглые ячейки камеры для элюции.
6. Проводят электрофорез в течение 45 мин при 150 В, в результате которого ДНК задерживается в высокосолевым буфере.
7. С помощью микропипетки на 100 мкл переносят высокосольевой буфер в объеме 300 мкл в пробирки Эппендорф.
8. Добавляют 1 мл холодного ($-20^\circ C$) этанола и охлаждают 15 мин в бане сухой лед/этанол.

9. Центрифугируют 15 мин при 12 000 об/мин и сливают супернатант.
10. Добавляют 500 мкл 70%-ного этанола, перемешивают и снова центрифугируют 5 мин при 12 000 об/мин, сливают супернатант и высушивают под вакуумом.
11. Растворяют в соответствующем объеме H_2O для добавления в лигирующую смесь (разд. 1.6).

1.5.5. Очистка специфических рестрикционных фрагментов путем фильтрования центрифугированием

1.5.5.1. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Оборудование для электрофореза в агарозном геле (разд. 5.3.2).
- УФ-трансиллюминатор (например, UV Products Ltd., модель TS-36).
- Защитные очки и маска для работы с ультрафиолетом.
- Пинцет с тупыми концами.
- Кусочки фильтра Millipore GVWP04700 или Genescreen (BRL (UK) Ltd.) размером $2,5 \times 2,5$ см.
- Пластиковые палочки для перемешивания (W. Sarstedt & Co.).

Растворы

- Растворы для электрофореза в агарозном геле (разд. 5.3).
- Буфер для элюции (50 мМ трис-HCl, pH 7,5; 0,1% ДСН).
На 100 мл:
2 М трис-HCl, pH 7,5 (разд. 1.4.2) 2,5 мл
25%-ДСН 0,4 мл
Готовят путем добавления компонентов к 97,9 мл H_2O .
- Фенол/хлороформ (1:1) (разд. 1.5.2.1).
- 5 М NaCl.
- 70%-ный этанол.
- Стерильная дистиллированная H_2O .

1.5.5.2. Методика (модифицирована по [62])

1. Вырезают рестрикционный фрагмент из 0,8%-ного агарозного геля в как можно меньшем объеме (см. разд. 1.5.4.2).
2. Собирают фильтрующее устройство следующим образом:
 - а) осторожно отрезают нижнюю коническую часть пробирки Эппендорф на 1,5 мл и протыкают отверстие в дне с помощью тонкой иглы от шприца;

- б) смачивают буфером для элюции 2,5-сантиметровый квадратный кусочек фильтра Millipore GVWP04700 или Genescreen, складывают вчетверо и с помощью тонкой закругленной на конце палочки, стараясь не разорвать фильтр, проталкивают его в конический держатель фильтра.
3. Помещают фрагмент геля в фильтрующее устройство, затем — в пробирку Эппендорф на 1,5 мл без крышки и центрифугируют 10 мин при 12 000 об/мин, а затем удаляют устройство для фильтрования, содержащее агарозу.
 4. Добавляют к фильтрату 100 мкл смеси фенол/хлороформ, депротеинизируют путем сильного встряхивания и центрифугируют 5 мин при 12 000 об/мин.
 5. Переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку.
 6. Повторяют стадии 4 и 5.
 7. Добавляют 100 мкл хлороформа, перемешивают и центрифугируют 1 мин при 12 000 об/мин.
 8. С помощью микропипетки Gilson отбирают и удаляют нижнюю органическую фазу.
 9. Оценивают объем раствора ДНК и добавляют 0,25 объема 5 M NaCl.
 10. Добавляют 3 объема этанола и охлаждают в бане сухой лед/этанол в течение 15 мин.
 11. Центрифугируют 15 мин при 12 000 об/мин и сливают супернатант.
 12. Добавляют 500 мкл 70%-ного этанола, снова центрифугируют 5 мин при 12 000 об/мин и сливают супернатант.
 13. Осадок высушивают под вакуумом, а затем ресуспендируют в соответствующем объеме H_2O для добавления в реакцию лигирования (разд. 1.6).

1.6. Лигирование фрагментов ДНК с векторами для трансформации растений

1.6.1. Основные положения

Лигирование представляет собой энергетически зависимую реакцию, в которой происходит ковалентное соединение фрагментов двуцепочечной ДНК, имеющей тупые или липкие концы (т. е. 5'- или 3'-выступающие концы). Фосфатные группы на 5'-концах конденсируются с близко расположенными 3'-гидроксильными группами, образуя непрерывный сахаро-фосфатный остов.

При рассмотрении вероятных форм продуктов лигирования важное значение имеют два фактора, i и j .

i — это общая концентрация самокомплементарных концов в реакции; она служит мерой вероятности взаимодействия одного из концов с другим комплементарным концом другой молекулы.

Если у фрагмента одинаковые комплементарные концы, то

$$i = 2N_0M \times 10^{-3} = 1,2 \times 10^{21} \text{ М концов/мл.}$$

Если у фрагмента различные, некомплементарные концы, то для каждого типа концов

$$i = N_0M \times 10^{-3} = 6,0 \times 10^{20} \text{ М концов/мл,}$$

где N_0 — число Авогадро, а M — молярная концентрация молекул ДНК.

j — это эффективная концентрация одного конца вблизи другого конца той же молекулы; она представляет собой меру вероятности, с которой каждый конец может взаимодействовать с другим комплементарным концом той же самой молекулы. Величина j определяется на основании допущения, что ДНК существует в форме стохастического клубка

$$j = \left[\frac{3}{2\pi lb} \right]^{2/3} = j\lambda \left[\frac{MW\lambda}{MW} \right]^{3/2} = \frac{6,2 \times 10^{22}}{(MW)^{3/2}} \text{ концов/мл,}$$

где l — контурная длина, b — длина сегмента стохастического клубка и MW — мол. масса молекулы ДНК, а $j\lambda$ и $MW\lambda$ — это соответствующие величины для бактериофага λ .

При рассмотрении популяции фрагментов ДНК одинаковой длины, каждый из которых имеет по два комплементарных конца, форму продуктов лигирования можно предсказать на основании соотношения $j:i$. При отношении $j:i=1$ образуются равные количества кольцевых мономеров и линейных димеров; $j:i>1$ сдвигает равновесие в сторону преимущественного образования кольцевых мономеров, а $j:i<1$ — преимущественного образования линейных конкатемеров. Преобразовав написанное выше равенство, получим формулу для вычисления концентрации ДНК в моль/л (M), необходимую для достижения определенного соотношения $j:i$.

$$[\text{ДНК}] = \frac{i}{j} \times \frac{51,1}{MW^{3/2}} M, \text{ когда } i = 2N_0M \times 10^{-3} \text{ концов/мл,}$$

или

$$[\text{ДНК}] = \frac{i}{j} \times \frac{25,6}{MW^{3/2}} M, \text{ когда } i = N_0M \times 10^{-3} \text{ концов/мл.}$$

На практике ситуация гораздо более сложна, чем описанная выше. Используемые для клонирования в плазидах фрагменты довольно коротки для модели стохастического клубка, чтобы можно было точно предсказывать их поведение, и обычно ока-

зывается, что при $j:i=1$ доминируют линейные конкатемеры. Лигирование обычно проводят между молекулами неодинаковой длины с различными величинами j . Поэтому для получения нужных продуктов необходимы различные концентрации концов этих молекул. При клонировании в плазидах требуемый конечный продукт обычно представляет собой кольцевой гетеродимер, для получения которого необходима компромиссная величина между низким соотношением $j:i$, чтобы стимулировать первоначальное межмолекулярное лигирование, и высоким отношением $j:i$, стимулирующим последующее образование колец. Кроме того, соотношение $j:i$ будет изменяться в процессе реакции: i уменьшится, поскольку концы станут лигированными и, следовательно, недоступными в качестве субстрата, а j уменьшится, поскольку молекулы становятся длиннее. В результате лигирования $j:i$ увеличивается и вероятность циркуляризации повышается.

Эмпирически оптимальное соотношение $j:i$ для образования кольцевых гетеродимеров приближается к 2 и его обычно вычисляют для меньшей из двух молекул. *Примечание: не забывайте, что i — это полная концентрация концов каждого типа и, следовательно, вклад в нее дают оба типа присутствующих фрагментов.* Поскольку нужный продукт содержит одну молекулу вектора и одну вставки, они должны присутствовать в одинаковых молярных концентрациях.

Для увеличения выхода кольцевых гетеродимеров используют различные стратегии, одна из которых, дефосфорилирование, описана в разд. 1.5.3. Данные методы обычно предотвращают замыкание в кольцо одного или обоих фрагментов до того, как произойдет межмолекулярная реакция. В случае, если один из наборов фрагментов не содержит немодифицированных самокомплементарных концов, эти методы позволяют проводить лигирование при более высоких величинах $j:i$, чтобы увеличить образование колец рекомбинантных молекул.

Использование приведенных выше уравнений иллюстрируется следующим примером, в котором фрагмент *CaMV-cat* размером 4,6 т. п. н. из гидролизованной *HindIII* *pUC18CaMVcat* лигируют в дефосфорилированный *HindIII* сайт плазмиды *pBin19* с образованием *pBin19 CaMV-cat*. Рестрикционные карты обеих плазмид и стратегия клонирования представлены на рис. 1.7. Необходимые свойства векторной плазмиды и вставки представлены в табл. 1.3.

Чтобы получить максимальный выход нужных кольцевых гетеродимеров, важно, чтобы немодифицированная вставка присутствовала в реакции лигирования в правильном соотношении $j:i$. Поскольку вектор модифицирован щелочной фосфатазой, он может быть лигирован только с немодифицированными концами

Таблица 1.3. Свойства векторной плазмиды и вставки

Фрагмент	Размер (т. п. н.)	Мол. масса	(концов/мл)
CaMV- <i>cat</i> × <i>Hind</i> III	4,6	$3,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{13}$
pBin19× <i>Hind</i> III	10,0	$6,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^{12}$

вставки и, следовательно, соотношение $j:i$ для вектора не имеет значения. Однако нужный продукт реакции содержит одну молекулу вектора и одну вставки, следовательно, они должны присутствовать в реакции лигирования в эквимольных соотношениях. Концентрация ДНК, необходимая для получения $j:i=2$ для вставки:

$$[\text{ДНК}] = \frac{1}{2} \times \frac{51,1}{(3,1 \times 10^6)^{3/2}} M = 4,7 \times 10^{-9} \text{ М.}$$

Поскольку необходимое соотношение молекул вектора и вставки составляет 1:1, каждый из фрагментов должен присутствовать в концентрации

$$\frac{4,7 \times 10^{-9}}{2} M = 2,3 \times 10^{-9} \text{ М.}$$

Следовательно, 20 мкл лигируемой смеси должны содержать

$$4,7 \times 10^{-9} \times 3,1 \times 10^6 \times 20 \text{ мкг} = 291 \text{ нг вставки (CaMV-cat} \times \text{Hind III)}$$

$$4,7 \times 10^{-9} \times 6,7 \times 10^6 \times 20 \text{ мкг} = 630 \text{ нг вектора (pBin19} \times \text{Hind III)}$$

Аналогичные вычисления можно использовать для определения условий лигирования при клонировании того же фрагмента в малый промежуточный вектор перед его коинтеграцией на более позднем этапе с хелперной *vir*-плазмидой, такой, как pGV3850.

Не все полученные в процессе лигирования рекомбинантные молекулы ДНК будут удовлетворять задаче эксперимента. По окончании лигирования обнаруживаются разнообразные молекулы, включая мультимеры вставок или вектора, лигированные на себя последовательности вектора и делетированные молекулы, образующиеся при действии на ДНК нуклеаз. После трансформации *E. coli* (разд. 1.7) лигированными молекулами необходимо идентифицировать колонии, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК нужного типа. Этот обычно двухступенча-

тый процесс вначале предусматривает идентификацию бактериальных колоний, несущих плазмиды со вставкой (для этого можно применить различные методы, такие, как инаktivация доминантного маркера, экспрессия новых фенотипических свойств или гибридизация ДНК из лизированных бактериальных колоний с радиоактивными пробами), и затем выделение клонированной ДНК путем получения «мини-препаратов» плазмид (разд. 1.8) с последующим гидролизом рестрикционными ферментами и анализом в агарозном геле (разд. 5.3).

Лигирование по тупым концам менее эффективно, чем лигирование липких концов, и проводится в других условиях инкубации. Ниже описана методика постановки реакции для липких концов на примере вектора *pBin19* и *HindIII*-фрагмента *CaMV-cat* в качестве вставки. Кроме того, приведена и методика лигирования по тупым концам.

1.6.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Водяная баня на 4°C (для лигирования «по липким концам») или на 22°C (для лигирования «по тупым концам»).

Растворы

- Растворы плазмидных ДНК: например, плазида *pBin19* (125 нг/мкл) и дефосфорилированная *pBin19*, расщепленная *HindIII* (125 нг/мкл), *HindIII*-фрагмент *CaMV-cat* (60 нг/мкл).
- Десятикратный буфер для лигирования [660 мМ трис-НCl, pH 7,6; 50 мМ $MgCl_2$, 50 мМ дитиотреитол (ДТТ), 10 мМ АТР]. На 1 мл:

2 М трис-НCl, pH 7,6	330,0 мкл
$MgCl_2$ (Sigma, шестиводный)	10,2 мг
1 М ДТТ (Sigma)	50,0 мкл
АТР (Pharmacia, двунариевая соль)	6,1 мг
Дистиллированная H_2O	до 1,0 мл

Приготовленный раствор следует разделить на аликвоты, хранить при $-20^\circ C$, оттаивать во льду непосредственно перед употреблением и использовать только однократно.

- 100 мМ спермидин. На 1 мл:

Спермидин (Sigma, тригидрохлорид)	25,5 мг
Дистиллированная H_2O	до 1,0 мл

Таблица 1.4. Контрольные пробы, постановка которых осуществляется параллельно реакции лигирования, где в качестве вектора используют pBin19, а HindIII-фрагмент CaMV-cat — в качестве вставки

Добавляемый объем (мкл)	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Нерасщепленный вектор	10	10	—	—	—	—
Расщепленный вектор	—	—	10	10	—	—
Расщепленный и дефосфорилированный вектор	—	—	—	—	10	5
Расщепленная вставка	—	—	—	—	—	5
Десятикратный буфер для лигирования	—	2	2	2	2	2
100 мМ спермидин	—	1	1	1	1	1
20 мМ АТР	—	1	1	1	1	1
Дистиллированная H ₂ O	10	5	6	5	5	5
T ₄ -ДНК-лигаза	—	1	—	1	1	1
Полный объем (мкл)	20	20	20	20	20	20

— 20 мМ АТР. На 1 мл:

АТР (Pharmacia, двунариевая соль) 12,2 мг
 Дистиллированная H₂O до 1,0 мл

— T₄-ДНК-лигаза (New England Biolabs, 400 000 ед/мл), разведенная до 0,1 ед./мл (для лигирования «по липким концам») или 1,0 ед./мл (для лигирования «по тупым концам») буфером для хранения, рекомендованным поставщиком фермента.

1.6.3. Методика (модифицирована по [39])

Представленная ниже методика широко используется для вставки рестрикционных фрагментов ДНК в малые клонирующие векторы. Однако, помимо концентраций ДНК вектора и вставки, участвующих в реакции лигирования, на эффективность лигирования и последующих этапов трансформации, следующих за инкубированием лигируемой смеси с компетентными клетками *E. coli* (разд. 1.7), могут влиять многие факторы. Таким образом, обычно проводят серию контрольных реакций для выявления возможных причин неудачного эксперимента. В табл. 1.4 представлены контроли, которые следует поставить в описанной ниже реакции лигирования. В табл. 1.5 приведены типичные результаты, отражающие число трансформантов, полученных при трансформации штамма JM83 *E. coli* этими лигированными смесями.

Пояснение. Результат лигирования обычно известен только после трансформации компетентных клеток. Цель постановки указанных контролей состоит в том, чтобы удостовериться, что все этапы, предшествующие трансформации, и сама трансформация

Таблица 1.5. Результаты типичного эксперимента по лигированию и трансформации

Номер пробирки	Селективная среда	Разведение	Число колоний	
1	NA	10^{-8}	185	
	NA+Km	10^{-2}	698	
	NA+Km	10^{-3}	73	
2	NA+Km	10^{-2}	659	
	NA+Km	10^{-3}	59	
3	NA+Km	10^0	52	
4	NA+Km	10^{-2}	272	
	NA+Km	10^{-3}	25	
5	NA+Km	10^0	69	
6	NA+Km+X-GAL+	10^0	Голубые	Белые
	+ИПТГ		34	86
	NA+Km+X-GAL+	10^{-1}	2	9
	+ИПТГ			

приводят к ожидаемому результату, поэтому любое отклонение от ожидаемой частоты в какой-либо пробе должно указать стадию, на которой произошел сбой.

Проба 1. Контроль трансформации для оценки эффективности трансформации клеток неразрезанным вектором.

Проба 2. Оценка влияния на эффективность трансформации всех компонентов, присутствующих в лигируемой смеси, кроме ДНК, по сравнению с числом колоний в пробе 1.

Проба 3. Остаточный фоновый уровень трансформации рестрицированной ДНК вектора.

Проба 4. Оценка влияния присутствия лигазы в пробе на возрастание доли трансформирующих молекул по сравнению с числом колоний в пробе 3.

Проба 5. При сравнении с числом колоний в пробах 3 и 4 этот контроль показывает, что дефосфорилирование не снижает эффективности трансформации, сохраняя фоновый уровень для линейных молекул вектора, и предотвращает увеличение эффективности трансформации за счет самолигирования немодифицированных молекул вектора.

Проба 6. Экспериментальный образец.

Лигирование по липким концам

1. Переносят векторную ДНК и ДНК вставки в микроцентрифужную пробирку Эппендорф в общем объеме до 15 мкл и помещают на лед.

2. Добавляют в следующем порядке:

Десятикратный буфер для лигирования ^{а)}	2 мкл
100 мМ спермидин	1 мкл
20 мМ АТР	1 мкл
Дистиллированную H ₂ O до 19 мкл	
0,1 ед./мкл T ₄ -лигазы	1 мкл

3. Перемешивают и инкубируют при 4 °С в течение ночи^{б)}.**Лигирование по тупым концам**

Лигирование по тупым концам осуществляется практически так же, как и лигирование по липким концам, за исключением того, что используют большее количество лигазы и температура инкубации составляет 22, а не 4 °С.

1. Переносят векторную ДНК и ДНК вставки в микроцентрифужную пробирку Эппендорф в полном объеме до 15 мкл и помещают на лед.**2. Добавляют в следующем порядке:**

Десятикратный буфер для лигирования ^{а)}	2 мкл
100 мМ спермидин	1 мкл
20 мМ АТР	1 мкл
Дистиллированную H ₂ O до 19 мкл	
1,0 ед./мкл T ₄ -лигазы	1 мкл

3. Перемешивают и инкубируют при 22 °С в течение ночи^{б)}.**Примечания**

^{а)} Буфер для лигирования следует однократно оттаять на льду и использовать немедленно.

^{б)} Для трансформации из каждой реакционной смеси для лигирования к компетентным клеткам необходимо добавить приблизительно по 10 нг ДНК. В представленном примере объем лигированной пробы следует довести до 185 мкл дистиллированной H₂O и 2 мкл из нее добавить к компетентным клеткам, как описано в разд. 1.7.3.

1.7. Введение рекомбинантных плазмид в клетки *E. coli* с помощью трансформации**1.7.1. Основные положения**

Впервые трансформацию *E. coli* очищенной ДНК осуществили в 1970 г. Мандел и Хига (Mandel, Higa [38]) путем инкубации бактерий с ДНК бактериофага λ в растворе CaCl₂ при 0 °С. Для трансформации *E. coli* плазмидой Коэн с соавторами (Cohen et al., [14]) использовал по существу те же условия. Последующее развитие метода плазмидной трансформации продолжалось эмпирически и современная процедура включает получение «ком-

петентных» клеток (т. е. компетентных для трансформации), которые можно использовать непосредственно или хранить в замороженном виде в состоянии компетентности, а затем использовать в нужный момент. Большинство методов включает взаимодействие бактерий и плазмиды при низкой температуре в присутствии дивалентных катионов, однако показано, что воспроизводимость и эффективность трансформации усиливают некоторые дополнительные факторы. К последним относятся используемый штамм и условия роста бактерий, качество воды и реактивов, использованных для приготовления растворов, чистота посуды и добавление диметилсульфоксида и дитиотрептола в буфер для трансформации (см. [23])^{a)}.

При трансформации *E. coli* рекомбинантными плазмидами — продуктами реакций лигирования — важно поставить контрольные опыты по трансформации как для установления эффективности трансформации используемых компетентных клеток, так и для проверки надежности селекции и методик скрининга. Как указывалось ранее в разд. 1.6, при использовании для трансформации лигированных смесей, а не интактных плазмид, обычно ставят другие контроли, чтобы следить за эффективностью лигирования с образованием кольцевых гетеродимеров и других продуктов реакции (табл. 1.4). В табл. 1.5 приведены результаты типичного эксперимента по лигированию и трансформации.

Ниже описана относительно простая методика, которая была оптимизирована^{a)} для штамма JM83^{b)} *E. coli* и должна обеспечить частоту трансформации в диапазоне $1-5 \times 10^7$ трансформантов/мкг^{b)} ДНК. Клетки хранят при -80°C в компонентном состоянии.

В приводимом примере колонии, содержащие нужную рекомбинантную плазмиду, растут и имеют белую окраску на чашках со средой NA+Km+X-GAL+ИПТГ. Устойчивость к Km обусловлена последовательностями pBin19, а белый цвет — инсерционной инактивацией гена β-галактозидазы в плазмиде pBin19 фрагментом CaMV-cat. Штамм JM83 имеет фенотип *Lac*⁻, и, следовательно, колонии, несущие плазмиды с функциональным геном β-галактозидазы (т. е. pBin19, не имеющие вставок), способны расщеплять X-GAL и имеют голубую окраску [24].

Проведя трансформацию, рекомендуется ставить контроль для оценки эффективности трансформации путем добавления аликвоты компетентных клеток к известному, ненасыщающему количеству неразрезанной плазмиды (например, 1 нг pBR322). Хорошо для контроля трансформации использовать плазмиду, которая сходна по размеру с ожидаемой рекомбинантной плазмидой, чтобы избежать недооценки эффективности лигирования^{г)}. В представленном примере (табл. 1.4) контролем трансформации служит проба 1.

1.7.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Качалка с круговым вращением и регулируемой температурой на 37°C с зажимами для стандартных и конических колб на 1 л.
- Водяная баня на 37°C.
- Термостат на 37°C.
- Полиалломерные центрифужные пробирки на 35 мл с полипропиленовыми закручивающимися крышками (например, Nalgene, тип 3119).
- Среднескоростная центрифуга с охлаждением (например, Sorval RC-5B или RT600B).
- Спектрофотометр, измеряющий поглощение в видимой области OD₅₅₀ (например, Perkin-Elmer).
- Одноразовые кюветы на 1 мл (Sarstedt).
- Небольшой сосуд Дьюара с жидким азотом.
- Кельвинатор на -80°C.

Бактерии

- Селективные чашки, содержащие колонии реципиентных бактерий для трансформации, например JM83 на NA+12,5 мкг/мл Sm (разд. 1.3.4).

Растворы^{а)}

- Лигированные пробы в соответствующем буфере (разд. 1.6).
- Контрольная неразрезанная плазмидная ДНК (например, pBin19 в концентрации 125 нг/мкл).
- ϕ -бульон (2% [вес на объем] бактотриптона Difco, 0,5% [вес на объем] дрожжевого экстракта Difco, 0,4% [вес на объем] MgSO₄, 10 mM KCl). На 1 литр:

Бактотриптон (Difco)	20,00 г
Дрожжевой экстракт (Difco)	5,00 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O (BDH Analar)	4,00 г
KCl (BDH Analar)	0,75 г

Стерилизуют автоклавированием и разливают по 5 мл в стерильные пластиковые универсальные колбы и по 100 мл в конические колбы емкостью 1 л.

- TFB 1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 20 mM ацетат калия, 10 mM CaCl₂, 15%-ный глицерин). На 50 мл:

1 M RbCl (Sigma)	5,00 мл
MnCl ₂ ·4H ₂ O (Sigma)	0,495 г
Ацетат калия (BDH Analar)	0,147 г

750 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) 0,67 мл

50%-ный глицерин (BDH Analar) 15,00 мл

Доводят pH до 5,8 ледяной уксусной кислотой, объем — H_2O и стерилизуют фильтрованием.

— TFB 2 (10 мМ MOPS, pH 7,0; 10 мМ RbCl ; 75 мМ CaCl_2 ; 15%-ный глицерин).

На 50 мл:

100 мМ MOPS (Sigma), pH 7,0 (доводят NaOH) 5,0 мл

1М RbCl (Sigma) 0,5 мл

750 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) 5,0 мл

50%-ный глицерин (BDH Analar) 15,0 мл

Доводят объем дистиллированной H_2O и стерилизуют фильтрованием.

— Чашки для селекции бактерий. В данном примере используют те же селективные чашки, что и для трансформации вектором pBin19:

NA

NA+Km

NA+Km+X-GAL+ИПТГ

Для других векторов могут использоваться другие антибиотики, а индикаторная система X-GAL/ИПТГ не всегда применяется.

1.7.3. Методика

Получение компетентных клеток *E. coli*

1. Со свежеприготовленной чашки с бактериями (например, штаммом JM83) с помощью стерильной петли засевают^{е)} одну колонию, ресуспендировав ее в 5 мл ф-бульона в стерильной стандартной пробирке, и инкубируют на качалке при 37 °C в течение 2—3 ч.
2. Инокулируют эту исходную культуру в 100 мл предварительно нагретого ф-бульона в конической колбе на 1 л и инкубируют на качалке при 37 °C до достижения $\text{OD}_{550}^{ж)}$ 0,35, т. е. культура находится в логарифмической фазе роста и содержит $3,5\text{--}4,0 \times 10^7$ клеток/мл). На это обычно уходит 2—3 ч. Для определения OD_{550} через короткие промежутки времени стерильной пастеровской пипеткой отбирают образцы культуры по 1 мл.
3. Переносят культуру в две закрытые крышкой центрифужные пробирки по 35 мл (2×35 мл) и охлаждают во льду 15 мин^{з)}.
4. Центрифугируют 5 мин при 2500 об/мин и 4 °C сливают супернатант.
5. Ресуспендируют клетки путем осторожного встряхивания в 10,5 мл холодного TFB 1, объединяют в одну пробирку и инкубируют на льду в течение 90 мин.

6. Центрифугируют 5 мин при 25 000 об/мин и 4 °С и сливают супернатант.
7. Осторожно ресуспендируют клетки в 2,8 мл холодного TFB 2 и отбирают аликвоту объемом 200 мкл в микроцентрифужную пробирку Эппендорф на 1,5 мл.

Эти клетки приобрели компетентность, и их можно либо немедленно использовать для трансформации, либо быстро заморозить в жидком азоте и хранить несколько месяцев при —80 °С при небольшом снижении эффективности трансформации.

Трансформация компетентных клеток E. coli

1. Оттаивают замороженные компетентные клетки при комнатной температуре до момента начала плавления и инкубируют на льду 10 мин. Можно использовать и свежеприготовленные компетентные клетки.
2. Добавляют их к 10 нг ДНК в максимальном объеме 10 мкл H₂O (например, 2 мкл десятикратно разведенной лигированной смеси из разд. 1.6, табл. 1.2), осторожно перемешивают и инкубируют во льду 20 мин.
3. Прогревают клетки (тепловой шок), инкубируя пробирки в водяной бане на 37 °С в течение 60 с и немедленно переносят в лед еще на 2 мин.
4. Добавляют 800 мкл ϕ -бульона и инкубируют на качалке при 37 °С в течение 50 мин^{а)}.
5. Осаждают клетки центрифугированием в течение 30 с в микроцентрифуге, удаляют супернатант и ресуспендируют клетки в 100 мкл ϕ -бульона.
6. Готовят последовательные десятикратные разведения суспензии клеток до 10⁻⁶, на каждом этапе добавляя 10 мкл клеток к 90 мкл ϕ -бульона. С помощью стерилизованного в пламени горелки и охлажденного стеклянного шпателя наносят (втирают) содержимое пробирок, содержащих разведения 10⁻⁶ и 10⁻⁵, на поверхность чашек с NA (это контроль жизнеспособности клеток) и разведения 10⁻², 10⁻¹ и 10⁰ на чашки с NA, содержащие соответствующие селективные антибиотики (например, Km в случае pBin19), и на чашки, содержащие как антибиотики, так и X-GAL+ИПТГ, при использовании векторов, имеющих систему скрининга рекомбинантных трансформантов по *LacZ* (табл. 1.5).
7. Подсушивают чашки в потоке стерильного воздуха в ламинарном боксе^{к)}.
8. Инкубируют чашки в перевернутом виде (крышкой вниз) при 37 °С в течение ночи.
9. Оценивают общее число колоний, выбирая участок чашки, содержащий разумное число колоний (например, 50—500), подсчитывая в нем число колоний и умножая на соответ-

вующий коэффициент. Подсчитывают частоту трансформации на чашках контроля трансформации (число трансформантов/мкг ДНК), чтобы убедиться, что эффективность трансформации достаточно высока. В табл. 1.5 приведены результаты типичного эксперимента лигирования/трансформации, в котором *Hind*III фрагмент плазмиды pUC18CaMV CAT длиной 4,6 т. п. н. встраивали в разрезанную *Hind*III и дефосфорилированную pBin19 с образованием pBin19CaMV cat (разд. 1.6.3).

Выживаемость клеток:

$$\frac{186 \times 10^6}{5} = 3,7 \times 10^7 \text{ клеток/мл.}$$

Частота трансформации для pBin19:

$$698 \times 10^2 \times \frac{1000}{12,5} = 5,6 \times 10^6 \text{ трансформантов/мкг.}$$

Ингибирование трансформации другими компонентами лигированной смеси в процентах:

$$\frac{698 - 659}{698} \times 100 = 6 \, \%.$$

Эффективность трансформации рестрицированной pBin19:

$$\frac{52}{659 \times 10^2} \times 100 = 0,08 \, \%.$$

Эффективность самолигирования pBin19:

$$\frac{272 \times 10^2}{659 \times 10^2} \times 100 = 41 \, \%.$$

Ингибирование самолигирования с помощью дефосфорилирования:

$$\frac{272 \times 10^2 - 69}{272 \times 10^2} \times 100 = 99 \, \%.$$

Общее число рекомбинантных колоний/мкг лигированной ДНК:

$$86 \times \frac{925}{10} \times \frac{1000}{925} = 8600 \text{ колоний/мкг.}$$

Примечания

а) Следует иметь в виду, что на эффективность трансформации наибольшее влияние оказывает следующее:

1) OD_{550} , при которой осаждают клетки.

2) Быстрое замораживание компетентных клеток в жидком азоте.

3) Добавление ДНК в наименьшем возможном объеме H_2O .

4) Тепловой шок при 37°C , а не при традиционной температуре 42°C . Если данную методику необходимо оптимизировать для другого штамма, а не JM83 или эффективность трансформации не достигает указан-

ного уровня, тогда наибольший успех может быть достигнут при варьировании вышеперечисленных условий.

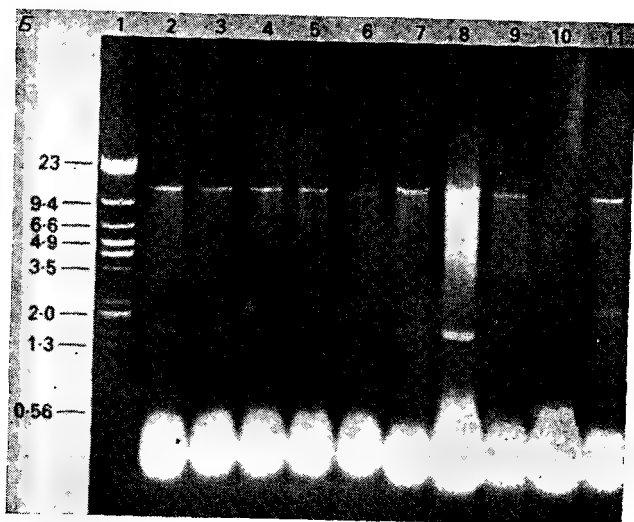
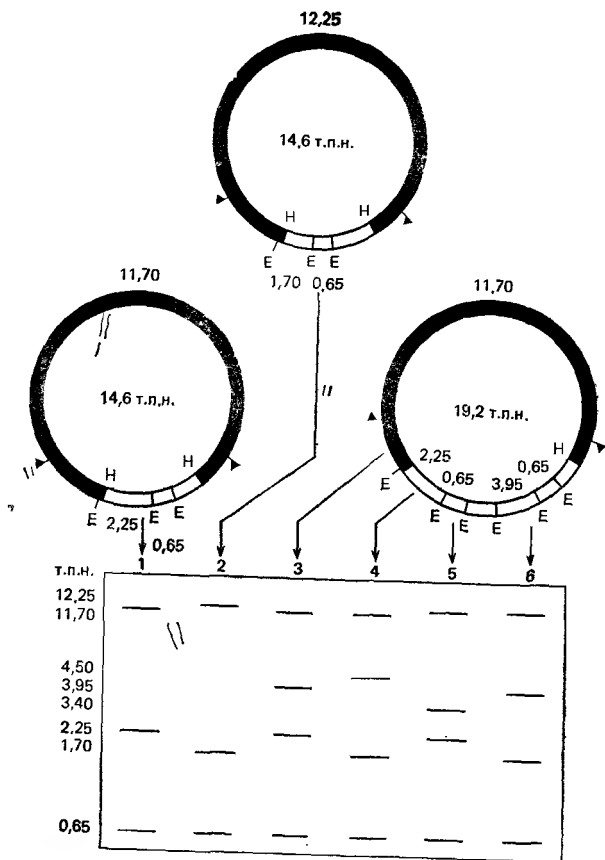
- 6) Многими исследователями доказано, что штамм JM83 удобен для трансформации по следующим причинам.
 - 1) Как правило, он дает высокие частоты трансформации.
 - 2) При выделении плазмид как в больших, так и в малых объемах он обеспечивает значительный выход плазмиды.
 - 3) Штамм несет хромосомный ген *Str*-резистентности, который позволяет вести селекцию против контаминирующих бактерий.
 - 4) Этот штамм имеет фенотип гес А⁻, что позволяет эффективно и воспроизводимо клонировать рекомбинантные ДНК.
 - 5) Этот штамм несет мутацию *lac*⁻, в результате чего возможен фенотипический скрининг на присутствие вставок при клонировании в плаزمидах, содержащих соответствующие *lacZ* конструкции, такие, как в pBin19 и pUC18.
- 7) Максимальное число трансформантов, получаемое при использовании данной партии компетентных клеток, зависит от двух факторов — доли компетентных клеток в препарате и эффективности их трансформации. Долю компетентных клеток можно определить путем сравнения числа трансформантов, полученных при насыщающем количестве плазмиды (например, 500 пг), по отношению к общему количеству выживших клеток в использованной для трансформации аликвоте. Для приведенной выше методики это составит от 1,5 до 2,0%. Эффективность трансформации можно определить по числу трансформантов, полученных при ненасыщающих количествах ДНК (например, 50 пг), для приведенной выше методики она составляет 10^7 — 10^8 трансформантов/мкг ДНК.
- 8) Поскольку эффективность трансформации выражается в единицах, отнесенных к весу, а не к количеству молекул, кажущаяся эффективность трансформации убывает линейно с увеличением размера плазмиды¹.
- 9) Эффективность трансформации зависит от чистоты реактивов и воды — всегда используйте наиболее чистые.
- 10) Старайтесь не захватить агар, поскольку он ингибирует трансформацию.
- 11) Число жизнеспособных клеток пропорционально OD₅₅₀ в широком диапазоне, а коэффициент пропорциональности зависит от штамма бактерий.
- 12) Очень важно, чтобы клетки, если их однажды охладили, в дальнейшем (насколько это возможно) находились во льду; переносить их из ледяной бани можно только для таких операций, как перемешивание, которое следует проводить быстро и осторожно.
- 13) Это необходимо, чтобы гены устойчивости к антибиотикам, которые ввели посредством трансформации, успели экспрессироваться.
- 14) Мокрый агар ингибирует формирование колоний при инкубации.

1.8. Быстрое выделение небольших количеств плазмидной ДНК *E. coli*

1.8.1. Основные положения

Получение мини-препаратов плазмид основано на тех же самых принципах, что и описанное выше выделение плазмид в больших объемах. Во многих лабораториях успешно использовались варианты данной методики для широкого диапазона

¹ По нашему опыту эта зависимость не линейная: при увеличении размера плазмиды вдвое эффективность трансформации падает примерно на порядок. — Прим. ред. пер.



комбинаций плазмид/бактериальных штаммов. Стадия очистки в градиенте плотности для экономии времени опущена, и, следовательно, получаемый препарат ДНК обычно недостаточно чист, чтобы его можно было использовать для каких-либо иных целей, кроме проверки правильности конструирования плазмид в трансформированных бактериях с помощью рестрикционного анализа (разд. 1.9) или при необходимости блоттинг-гибридизации по Саузерну. В случае векторов для трансформации растений необходимо проверять структуру рекомбинантных плазмид в *E. coli*, прежде чем перенести их в агробактерии с помощью конъюгации (разд. 1.10). В разд. 1.9 приведена схема рестрикционного анализа мини-препаратов плазмид (рис. 1.11), выделенных из случайно выбранных колоний трансформантов штамма JM83, предположительно содержащих рекомбинантные плазмиды pBin19 (т. е. белые Km^r-колонии на чашках со средой NA+Km+X-GAL+ИПТГ).

1.8.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1[1]).
- Качалка на 37 °С с зажимами для универсальных пробирок (например, Gallenkamp).
- Баня сухой лед/этанол.

Растворы

- NB+селективные антибиотики для используемых штаммов бактерий (по 5 мл в стандартных пробирках).
- Лизирующий раствор, см. разд. 1.4.2.
- Щелочной ДСН, см. разд. 1.4.2.
- 3 М ацетат натрия, pH 4,8. На 400 мл: Растворяют 98,44 г ацетата натрия (BDH Analaг, безводный) в 200 мл H₂O. Добавляют pH до 4,8 ледяной уксусной кислотой (BDH Analaг),

Рис. 1.11. Использование рестриктазы *EcoRI* для анализа предполагаемых конструкций pBin19CaMV-cat в *E. coli*.

А. Предполагаемые размеры фрагментов после расщепления *EcoRI* рекомбинантных плазмид, образующихся в результате единичной вставки фрагмента в двух возможных ориентациях и четырех возможных вариантах лигирования двух тандемных вставок в исходном векторе.

Б. Результаты расщепления *EcoRI* различных мини-препаратов ДНК в эксперименте по лигированию. Дорожки 2—5 и 7—9 содержат фрагменты, соответствующие предсказываемой конфигурации 2; фрагменты дорожки 11 соответствуют предсказываемой конфигурации 1. В дорожке 6 можно видеть дополнительный фрагмент длиной 7 т. п. н., а дорожка 10 не содержит ни одного из ожидаемых фрагментов. Конструкции в последних двух дорожках, видимо, претерпели делеции и/или другие перестройки ДНК в процессе лигирования.

затем объем водой — до 400 мл, автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

- ТЭ-буфер, см. разд. 1.4.2.
- 2 М ацетат натрия, pH 5,6 — см. разд. 1.4.2.
- Фенол/хлороформ (1 : 1), см. разд. 1.5.2.1.
- Хлороформ.
- Этанол (—20 °C).

1.8.3. Методика (модифицирована по [10])

1. Засевают отдельные колонии, несущие предполагаемые рекомбинантные плазмиды, в 5 мл NB, содержащего селективные антибиотики (например, 50 мкг/мл К_т для pBin19CaMV-cat в *E. coli*), и инкубируют на качалке в течение ночи^{a)} при 37 °C.
2. Разливают по 1,5 мл суспензии клеток в микроцентрифужные пробирки и собирают клетки центрифугированием при 12 000 об/мин в течение 2 мин^{b)}.
3. Удаляют супернатант и ресуспендируют клетки в 100 мкл лизирующего раствора. Оставляют во льду на 5 мин.
4. Добавляют 200 мкл щелочного ДСН и осторожно перемешивают до тех пор, пока суспензия не станет прозрачной и вязкой. Оставляют во льду на 5 мин.
5. Добавляют 150 мкл 3 М ацетата натрия (pH 4,8) и переворачивают пробирку несколько раз, пока не образуется комок ДНК. Оставляют во льду на 10 мин.
6. Центрифугируют в микроцентрифуге 10 мин (в результате должен образоваться прозрачный надосадок) и переносят супернатант в новую пробирку.
7. Добавляют к супернатанту 1 мл холодного (—20 °C) этанола, хорошо перемешивают и помещают в баню сухой лед/этанол на 15 мин.
8. Собирают преципитат путем центрифугирования при 12 000 об/мин (максимальная скорость микроцентрифуги) 10 мин.
9. Осторожно сливают супернатант и растворяют осадок в 100 мкл ТЭ-буфера.
10. Добавляют 100 мкл смеси фенол/хлороформ, хорошо перемешивают и разделяют фенольную и водную фазы путем центрифугирования в течение 10 мин при 12 000 об/мин.
11. Переносят верхнюю водную фазу в чистую пробирку, добавляют 100 мкл хлороформа, перемешивают и разделяют две фазы с помощью центрифугирования при 12 000 об/мин в течение 2 мин.
12. Отбирают и выбрасывают нижнюю фазу, содержащую хлороформ, к оставшемуся супернатанту добавляют 10 мкл 2 М ацетата натрия (pH 5,6).

13. Добавляют 1 мл холодного (-20°C) этанола, перемешивают и инкубируют 15 мин в бане сухой лед/этанол.
14. Собирают преципитат с помощью центрифугирования при 12 000 об/мин 10 мин и удаляют супернатант. Добавляют 1 мл 70%-ного этанола и снова центрифугируют 5 мин.
15. Сливают надосажок, высушивают ДНК под вакуумом и растворяют в 50 мкл $\text{H}_2\text{O}^{\text{в)}}$.

Примечания

- ^{а)} Достаточно 8 ч для роста.
- ^{б)} Все растворы, кроме щелочного ДСН, следует держать во льду.
- ^{в)} Полученный препарат ДНК должен быть достаточно чистым для гидролиза рестриктазами; 10 мкл достаточно для каждой рестриктируемой пробы.

1.9. Анализ мини-препаратов ДНК с помощью рестрикционного гидролиза и электрофореза в агарозном геле

1.9.1. Основные положения

Использование рестрикционных ферментов для расщепления ДНК и анализ полученных фрагментов с помощью электрофореза в агарозном геле подробно обсуждаются в разд. 5.2 и 5.3, поэтому в данном разделе мы на этих вопросах останавливаться не будем.

Для расщепления большинства препаратов плазмидных ДНК требуется в 2—3 раза больше ферментов, чем для разрезания эквивалентного количества очищенной стандартной ДНК (например, ДНК бактериофага λ), по отношению к которой обычно определяют ферментативную активность рестриктаз. Мини-препараты плазмид могут содержать примеси, которые уменьшают активность этих ферментов, а концентрация плазмидной ДНК вместе с примесью хромосомной ДНК варьирует. Таким образом, мини-препараты ДНК обычно гидролизуют в присутствии (5—10)-кратного избытка фермента в течение 1 ч или (2—3)-кратного избытка в течение нескольких часов. Рестрикционное расщепление плазмид часто дает фрагменты, вместе с которыми мигрируют, затрудняя их идентификацию, большие количества РНК, неизбежно загрязняющие мини-препараты. Такие фрагменты можно визуализировать путем обработки препаратов перед электрофорезом^{а)} РНКазой^{б)}, не содержащей примесей ДНКаз.

При анализе предполагаемых рекомбинантных векторных плазмид для трансформации растений, чтобы убедиться, действительно ли получена желаемая вставка, особое внимание сле-

дует уделить подбору рестрикционных ферментов. При обработке ими плазмиды с желаемой конфигурацией вектора/вставки необходимо получить уникальный и легко идентифицируемый набор фрагментов. Для этого обычно необходимы подробные рестрикционные карты как вектора, так и вставки. Если это возможно, следует гидролизовать исходную родительскую плазмиду таким образом, чтобы получить фрагменты, соответствующие некоторым из фрагментов, получаемым при рестрикции рекомбинантной плазмиды, поскольку комиграция фрагментов всегда более доказательна, чем определение размера путем сравнения с маркерами мол. массы^{в)}.

В данном разделе анализ мини-препаратов представлен на примере предполагаемых рекомбинантных плазмид, представляющих лигирование *Hind*III-фрагмента длиной 4,6 т. п. н. *CaMV-cat* в *Hind*III-сайт вектора для трансформации растений *pBin19* (рис. 1.11). Как видно из рис. 1.11, А, расщепление мини-препарата ДНК плазмиды рестриктазой *Eco*RI дает информацию как о числе, так и об ориентации вставок, содержащихся в конструкции. Ожидаемые размеры рестрикционных фрагментов для нужной конструкции составляют либо 11,7, 2,25 и 0,65 т. п. н., либо 12,25, 1,70 и 0,65 т. п. н. Такие фрагменты можно видеть на рис. 1.11, Б — дорожки 2—5, 7—9 и 10 соответственно. По образованию дополнительных зон или отсутствию ожидаемых определяют, что рекомбинантная плазида имеет неправильную структуру, и клоны, несущие такие плазмиды, можно выбросить.

Примечания

- а) Обычно наносят по 0,1 мкг ДНК для каждой ожидаемой зоны, однако в геле можно увидеть и 40 нг.
- б) К каждой расщепляемой пробе добавляют по 2 мкл раствора предварительно обработанной прогреванием РНКазы А (BRL) и инкубируют при комнатной температуре 2 мин. Добавляют 5 мкл буфера для нанесения на гель и держат во льду до нанесения на агарозный гель для анализа.
- в) Обычно в качестве маркеров размера используют ДНК фага λ , разрезанную *Hind*III или *Eco*RI. Мол. массы соответствующих рестрикционных фрагментов приведены в разд. 5.3.3 (примечание в).

1.10. Конъюгационный перенос рекомбинантных плазмид в агробактерии

1.10.1. Основные положения

Конъюгацию, необходимую для переноса нужной плазмиды из *E. coli* в агробактерию, наиболее удобно осуществить с помощью трехродительского скрещивания [55]. Обычно применя-

ют две системы конъюгации — первая для промежуточных векторов на основе репликона Col E1, используемых в сочетании с векторами коинтегративного типа, и вторая для репликона RK2, на основе которого сконструированы многие бинарные векторы. Для обеспечения функций мобилизации (*mob*) и переноса (*tra*), действующих в транс-положении, используют плазмиды-помощники конъюгации («хелперные» плазмиды), специфичные для репликонов обоих типов, либо на отдельных репликонах, либо интегрированные с хромосомой в специальных хозяйских штаммах агробактерий [36]. Для того чтобы система конъюгации функционировала, клонирующие векторы должны содержать специфичное начало переноса («ориджин» — *oriT*) и сайт активации (*bom*), на которые действуют продукты генов *tra* и *mob*.

Репликоны Col E1

Во время трехродительского скрещивания плазмиды-помощники (обычно pGJ28 и pR64drd11) с высокой частотой переносятся в штамм *E. coli*, несущий рекомбинантную плазмиду. Плазмиды-помощники затем обеспечивают перенос в агробактерии всех трех плазмид, происходящий с частотой около 10^{-4} — 10^{-5} (рис. 1.5, В). В трехродительском скрещивании все три штамма смешивают вместе и селекционируют желаемые агробактерии-трансконъюганты. В другом случае можно осуществить эту процедуру путем проведения сначала двухродительского скрещивания между штаммом *E. coli*, несущим промежуточный вектор, и штаммом *E. coli*, несущим плазмиду-помощник, прежде чем проводить второе скрещивание между первым трансконъюгантом и штаммом агробактерий, несущим функции *vir*-помощника. В системах с *цис*-действующей *vir*-областью (например, pGV3850) последовательности вектора сохраняются благодаря гомологичной рекомбинации с резидентной плазмидой-помощником вирулентности^а). Образование коинтегрантов происходит с довольно низкой частотой, и обычно в результате образуется гораздо меньше стабильных трансконъюгантов с векторами *цис*-типа, чем с бинарными векторами.

Репликоны RK2

В большинстве клонирующих векторов бинарных систем используют начало репликации RK2 и для их конъюгационного переноса обычно используют функции помощника плазмиды pRK2013 [18]. Мобилизация и в этом случае иногда проводится с помощью двух двухродительских скрещиваний, а чаще — с помощью одного трехродительского скрещивания. Частота мобилизации обычно составляет около 10^{-2} — 10^{-3} и, следовательно, более эффективна, чем частота, достигаемая для репли-

конов Col E1. В отличие от промежуточных векторов репликоны RK2 сохраняются в агробактериях (при селекции) без образования коинтегрантов, и, таким образом, трансконъюганты отбираются с гораздо более высокой частотой.

Многие часто используемые акцепторные штаммы агробактерий содержат локализующийся в хромосоме ген устойчивости к рифампицину (Rf), а большинство клонирующих векторов обоих типов (табл. 1.1 и 1.2) содержат маркеры устойчивости к антибиотикам прокариотического происхождения, отличным от Rf, в том числе Km, Sm, Tc и Am. Таким образом, трансконъюганты агробактерий, содержащих рекомбинантные последовательности, можно селективировать как колонии, резистентные к Rf, а также к Km, Sm, Tc и Cb. На практике могут происходить некоторые перестройки или делеции перенесенных последовательностей, и, таким образом, проверка конструкций в трансконъюгантах (разд. 1.11 и 1.12) — это необходимая мера предосторожности. Рассмотрим в качестве примера трехродительские скрещивания, цель которых — введение рекомбинантных векторов трансформации pBin19 в штамм *vir*-помощник LBA4404. Для селекции трансконъюгантов агробактерий, несущих предположительно плазмиду pBin19CaMV-*cat*, можно использовать высев на чашки с NA+Rf+Km. Ни один из двух штаммов *E. coli* не устойчив к Rf, так что только агробактерии могут образовывать колонии на этих чашках. Для селекции последовательностей pBin19 в трансконъюгантах используют камицин.

1.10.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1[1]).
- Стерильные зубочистки.
- Термостатируемые качалки с круговым вращением и регулирующей температуры на 37 и 28 °C с зажимами для универсальных пробирок.
- Термостат на 28 °C.

Бактерии

- Свежие культуры бактерий на чашках:
 - А. Штамм-помощник (например, HB101/pRK2013).
 - Б. Реципиентные штаммы агробактерий (например, LBA4404).
 - В. Колонии с чашек, на которых проводилась селекция трансформантов, содержащие проверенные рекомбинантные векторы для трансформации растений (например, pBin19 CaMV-*cat*).

Растворы

- Жидкие среды (по 5 мл в стандартных пробирках):
- А. NB+селективные антибиотики для штаммов *E. coli* (помощника и донора) (например, 50 мкг/мл Km для HB101/pRK2013 и 100 мкг/мл Km для pBin19CaMV-cat).
 - Б. NB+селективные антибиотики для реципиентных штаммов (например, 100 мкг/мл Rf для LBA4404).
 - В. NB.
- Агаризованные среды (чашки Петри диаметром 9 см, содержащие по 20 мл среды):
- А. NA (для конъюгации).
 - Б. Чашки для селекции трансконъюгантов с NA (т. е. NA+Rf+Km для селекции трансконъюгантов pBin19 в LBA4404).

1.10.3. Методика

1. Засевают отдельные колонии донора (т. е. те, которые, согласно данным рестрикционного анализа, по-видимому, содержат правильные конструкции) и штамма-помощника *E. coli* в 5 мл среды NB, содержащей селективные антибиотики, и инкубируют на качалке в течение ночи при 37 °С.
2. Засевают отдельные колонии реципиентных штаммов *A. tumefaciens* в 5 мл NB+селективные антибиотики и инкубируют на качалке в течение ночи при 28 °С.
3. Переносят с помощью пипетки по 100 мкл каждого из трех скрещиваемых штаммов (т. е. донора, помощника и реципиента) на одну из чашек с NA и смешивают путем растирания. Каждое трехродительское скрещивание проводят дважды и инкубируют в течение ночи при 28 °С.
4. С помощью стерильной петли отбирают по 2 «штриха» с каждой чашки, ресуспендируют в 500 мкл NB и засевают штрихом на 2 чашки с NA⁶⁾, содержащие селективные антибиотики как для агробактерий, так и для отбора введенных рекомбинантных последовательностей.
5. Инкубируют двое суток при 28 °С, в течение которых должны появиться отдельные колонии агробактерий-трансконъюгантов^{а)}.

Примечания

- ^{а)} Кроме того, можно отделить агробактерии от *E. coli* на основе их способности к росту на минимальной среде, но эта селекция требует осторожности, поскольку *E. coli* может расти на небольших количествах питательных веществ, которые вводятся при небрежном засеве петель.
- ^{б)} Поскольку для введения последовательностей в *cis*-векторы необходимо участие не только конъюгации, но и рекомбинации, в этом случае можно получить приблизительно в 1000 раз меньшее количество колоний

трансконъюгантов агробактерий по сравнению с ожидаемым в эквивалентной бинарной системе.

- *) Агробактерии никубируют при 28 °С, поскольку Ti-плазмиды не сохраняются при температуре выше 32 °С.

1.11. Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из *A. tumefaciens*

1.11.1. Основные положения

После получения трансконъюгантов последовательности вектора необходимо заново проверить уже в агробактериях, чтобы быть уверенным, что во время конъюгации не произошли перестройки или делеции. Кроме того, используя векторы *цис*-типа, такие, как pGV3850, необходимо продемонстрировать образование коинтегранта последовательностей промежуточного вектора с вектором для трансформации растений, определить их взаимную ориентацию и убедиться, что образование коинтегранта не привело к перестройкам встраиваемых последовательностей. Неонкогенные трансформирующие Ti-плазмидные векторы *цис*-типа — это низкокопийные мегаплазмиды размером около 180—250 т. п. н. Для характеристики таких больших плазмид, выделение которых требует специальных методов, необходимо получить тотальный препарат нуклеиновых кислот с последующим анализом ДНК путем гибридизации по Саузерну, чтобы идентифицировать специфичные последовательности. Точно так же, чтобы охарактеризовать бинарные векторы, которые тоже представляют собой низкокопийные плазмиды, при репликации в агробактериях необходимо выделить суммарные нуклеиновые кислоты.

Для выделения используют небольшие объемы ночных культур. Методика включает ферментативную обработку агробактерий с последующим удалением белков из экстракта смесью фенол/хлороформ и концентрирование нуклеиновых кислот путем осаждения этанолом. Описанная ниже методика успешно использовалась для ряда штаммов агробактерий. В следующем разделе 1.12 представлены результаты расщепления суммарной ДНК агробактерий ферментами рестрикции и примеры анализа по Саузерну последовательностей плазмид, содержащихся в различных мини-препаратах тотальной нуклеиновой кислоты агробактерий.

1.11.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

— Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1[1]).

— Стерильные зубочистки.

Бактерии

- Предполагаемые трансконъюганты из трехродительских скрещиваний.
- Реципиентный штамм агробактерий в качестве контроля (например, LBA4404).

Растворы

- NB+селективные антибиотики (по 5 мл в стандартных пробирках) для выращивания трансконъюгантов и контрольных штаммов (например, см. разд. 1.10.2).
- 5%-ный «саркозил» («Sarkosyl», Sigma, N-lauroylsarcosine, натриевая соль) в ТЭ-буфере.
- 5 M NaCl (292,2 г/л).
- ТЭ-буфер; см. разд. 1.4.2.
- Раствор проназы [5 мг/мл проназы (Sigma) в ТЭ-буфере]. Предварительно необходимо подготовить раствор путем самопереваривания проназы в течение 2 ч при 37 °C и хранить при —20 °C.
- Смесь фенол/хлороформ (1:1), см. разд. 1.5.2.1.
- 100- и 70%-ный этанол (—20 °C).

1.11.3. Методика (модифицирована по [17])

1. С помощью стерильной зубочистки переносят отдельную колонию агробактерий в 5 мл NB, содержащего селективные антибиотики, и инкубируют в течение ночи на качалке^{a)} при 28 °C.
2. Переносят 1,5 мл культуры в микроцентрифужную пробирку и собирают клетки путем центрифугирования 5 мин при 12 000 об/мин.
3. Удаляют супернатант и ресуспендируют клетки в 300 мкл ТЭ-буфера.
4. Добавляют 100 мкл 5%-ного саркозила в ТЭ-буфере и перемешивают.
5. Добавляют 150 мкл раствора проназы (5 мг/мл) и перемешивают.
6. Инкубируют 1 ч при 37 °C.
7. Добавляют 500 мкл смеси фенол/хлороформ и с помощью микродозатора Gilson P1000 на 1 мл осторожно пипетируют смесь 5 раз для снижения вязкости бактериального лизата.
8. Разделяют водную и органическую фазы путем центрифугирования при 12 000 об/мин в течение 5 мин.
9. Переносят водный супернатант в чистую пробирку и трижды проводят его экстракцию. Для этого добавляют 500 мкл

смеси фенол/хлороформ, осторожно перемешивают фазы с образованием эмульсии, центрифугируют при 12 000 об/мин 5 мин и переносят верхнюю водную фазу в чистую пробирку.

10. Оценивают объем водной фазы и добавляют 0,05 объема 5 М NaCl до конечной концентрации 0,25 М. Добавляют 3 объема холодного (-20°C) этанола и оставляют при -20°C на 1—2 ч.
11. Собирают нуклеиновую кислоту с помощью центрифугирования при 12 000 об/мин в течение 10 мин. Сливают супернатант, промывают осадок 1 мл 70%-ного этанола и снова собирают нуклеиновые кислоты центрифугированием (12 000 об/мин, 10 мин).
12. Осторожно удаляют супернатант и немного подсушивают осадок под вакуумом^{б)}.
13. Ресуспенсируют осадок в 50 мкл H_2O .

Примечания

- а) Поскольку время генерации агробактерий обычно составляет около 2 ч, а *E. coli* — около 20 мин, для достижения требуемого роста клеток как жидкие культуры, так и чашки с агробактериями можно инкубировать в течение 2 сут.
- б) Не высушивайте полностью осадок нуклеиновой кислоты, поскольку в этом случае его практически невозможно ресуспендировать в воде.

1.12. Рестрикционный гидролиз тотальной ДНК агробактерий

1.12.1. Основные положения

Рестрикционный гидролиз ДНК и метод блоттинг-гибридизации по Саузерну более подробно описаны в гл. 5. Однако в настоящем разделе мы остановимся на некоторых частных аспектах, специфически связанных с анализом векторных последовательностей в агробактериях.

Рестрикционный гидролиз суммарной ДНК из агробактерий вместе с методом блоттинг-гибридизации по Саузерну можно использовать не только для доказательства образования коинтеграта специфичной чужеродной последовательности ДНК с Ti-плазмидным вектором *цис*-типа или сохранения ее в бинарном векторе *транс*-типа, но и для определения организации перенесенной ДНК. Для анализа необходимо выбрать фермент, дающий характерный набор рестрикционных фрагментов. В случае коинтегративных векторов важно подобрать рестриктазу и пробы для гибридизации, с помощью которых можно визуализировать как внутренние последовательности, так и фрагменты стыков. Как и при любой методике блоттинг-гибри-

дизации по Саузерну, в гель необходимо внести контрольные образцы ДНК, например исходные векторные молекулы (отрицательный контроль) и очищенную плазмиду, из которой была получена вставка ДНК (положительный контроль), а также радиоактивно меченные маркеры мол. массы (см. гл. 5).

Как и мини-препараты плазмид *E. coli*, суммарная ДНК агробактерий может быть не очень чистой и концентрация ее неизвестна. Обычно 10 мкл достаточно для рестрикционного расщепления и блоттинга; следует отметить следующие моменты.

— Убедитесь, что нуклеиновая кислота полностью растворилась. Это позволит избежать вязкости при нанесении на агарозный гель и трудностей с рестрикционным расщеплением. При успешном расщеплении после электрофореза получается размазанная по всей длине дорожки полоса ДНК, содержащая отдельные видимые зоны (рис. 1.12, А, дорожки 3—8).

— Неполное расщепление — часто встречающееся затруднение. Чтобы решить эту проблему, можно сделать следующее:

- А. Увеличить конечный объем реакционной смеси.
- Б. Увеличить количество используемой рестриктазы.
- В. Увеличить время рестрикции (реакцию можно оставить на ночь, если это удобно).
- Г. Провести дополнительную депротеинизацию препарата смесью фенол/хлороформ, переосадить нуклеиновую кислоту этанолом и отмыть 70%-ным этанолом перед расщеплением ферментами.

На рис. 1.12, А показан типичный результат анализа, основанного на нашем примере. В дорожках 3—7 (рис. 1.12, А) находятся расщепленные *HindIII* ДНК из трансконъюгантов пяти трансформантов *E. coli* (см. рис. 1.11), для которых было показано, что они несут правильные конструкции. Дорожка 2 содержит *HindIII*-фрагмент *CaMV-cat* (положительный контроль гибридизации), а дорожка 8 — расщепленную *HindIII* ДНК LBA4404 (отрицательный контроль). Отметим, что во всех дорожках ДНК рестриктирована, видны многочисленные дискретные полосы и содержится небольшое количество высокомолекулярной ДНК, остающейся после электрофореза в начале геля (вблизи ячеек для нанесения ДНК). Плохо расщепленная ДНК имеет тенденцию тянуться, быть вязкой, дает мало дискретных полос (если вообще дает) и состоит главным образом из высокомолекулярных фрагментов.

Гель (рис. 1.12, А) переносили с помощью блоттинга по Саузерну на микропористый фильтр и гибридизовали с *cat*-специфичной пробой, как описано в гл. 5. Полученный радиоавтограф представлен на рис. 1.12, Б. Как в положительном контроле, так и в дорожках 3—7 можно видеть сильную и специ-

фичную гибридизацию, тогда как в ДНК LBA4404 (дорожка 8) таковая не наблюдается. При расщеплении *Hind*III образует фрагмент, который мигрирует так же, как *Hind*III-фрагмент *CaMV-cat* и гомологичен ему. Следовательно, можно заключить, что все проверенные трансконъюганты содержат желаемые конструкции, которые, видимо, сохранили свою целостность во время процесса конъюгации.

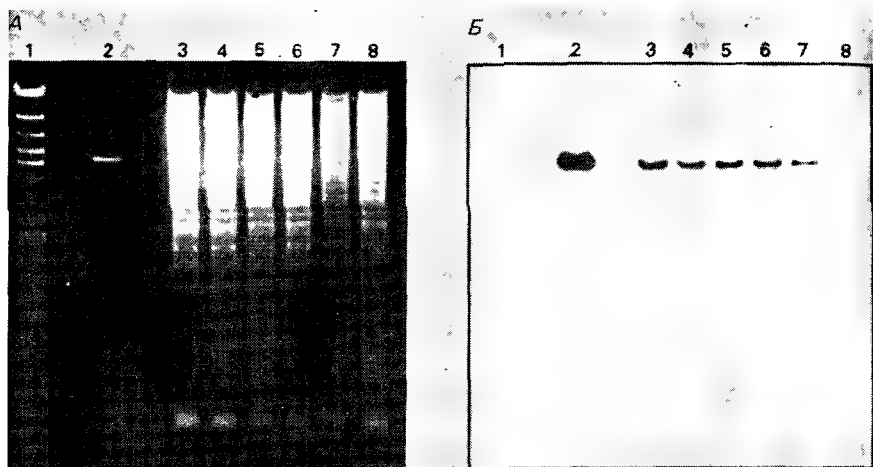


Рис. 1.12. Анализ плазмиды rBin19CaMV-*cat* в LBA4404 с помощью блоттинг-гибридизации по Саузерну.

А. Агарозный гель после окрашивания бромистым этидием. Дорожка 1 — маркеры мол. массы, состоящие из ДНК фага λ , разрезанной *Hind*III и *Hind*III+*Eco*RI. 2. *Hind*III-фрагмент *CaMV-cat* размером 4,6 т. п. н. 3—7. Расщепленные *Hind*III ДНК из различных клонов трансконъюгантов. 8. ДНК LBA4404, расщепленная *Hind*III.

Б. Радиоавтограф геля (А) после переноса и гибридизации с *cat*-специфичной пробой (описание пробы см. в разд. 3.2.3.2).

Приложение 1 [I]

Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований

- Автоматические микропипетки Gilson, P20, P200, P1000 (Aп-chem Ltd.)
- Наконечники для пипеток Gilson в штативах (автоклавируемые и высушенные):
 - Желтые (P20, P200)
 - Синие (P1000)

- Настольная микроцентрифуга (MSE Scientific Instruments Ltd.).
- Микроцентрифужные пробирки Эппендорф на 1,75 мл, стерилизованные в закрытом фольгой стакане из пирекса на 500 мл (W. Sarstedt & Co.).
- Ведерко для льда и измельченный лед.
- Плавающий штатив из полистирола для пробирок типа Эппендорф.
- Водяные бани для неподвижной инкубации (Gallenkamp).
- Кипящая водяная баня (Gallenkamp).
- Морозильники, -20 и -80°C .
- Холодильник.
- Электронные весы и чашки для взвешивания.
- Магнитные мешалка и палочки.
- Миксер (встряхиватель для пробирок).
- Шпатели, пинцеты, скальпели, ножницы и т. п.
- Фломастеры для стекла.
- Микробиологическая петля.
- Горелка Бунзена.
- Бактериологический шпатель (стеклянный).
- Большая емкость с дезинфицирующим раствором для сбора жидких отходов.
- Таймер.
- Контейнеры («Cinbins» — Metal Box PLC):
 - А. Для загрязненных бактериями наконечников.
 - Б. Для загрязненных ^{32}P наконечников.
 - В. Для загрязненных ^{35}S наконечников.
 - Г. Для загрязненных ^{14}C наконечников.
- Ткань, не оставляющая волокон (Kleenex tissues) (Kimberley — Clark Ltd.).
- Адсорбирующие бумажные полотенца (Kimberley — Clark Ltd.).
- Benchkote (Whatman).
- Лента Nescofilm (BDH).
- Пленка Saran wrap (Dow Chemical Company Ltd.).
- Наклейки, предупреждающие об электрической, газовой и радиационной опасности.
- Наклейки Scotch Magic tape (3M United Kingdom PLC. (UK)).
- Одноразовые резиновые перчатки (например, Surgikos Ltd., Microtouch.).
- Пластиковые одноразовые чашки Петри (Sterilin Ltd.).
- Пластиковые одноразовые стандартные пробирки (Sterilin Ltd.).
- Стеклоянные стандартные пробирки.
- Конические колбы на 2 л, 500 и 250 мл.

- Пластиковые кюветы (на 3, 1 и 0,5 мл).
- Стеклоянные стаканы и измерительные цилиндры из пирекса от 50 мл до 2 л.

Приложение 1 [II]

А. Используемые в примерах бактериальные штаммы

Наименование	Описание	Устойчивость к антибиотикам	Источник
JM83	<i>E. coli</i>	Sm	[41]
C58C1 (pGV3850)	<i>A. tumefaciens</i>	Cb, Rf	[61]
GJ23	<i>E. coli</i>	Km, Tc	[55]
LBA4404	<i>A. tumefaciens</i>	Rf	[29]
HB101/pRK2013	<i>E. coli</i>	Km	[18]
MC1022/pBin19	<i>E. coli</i>	Km	[8]

Б. Антибиотики, используемые для селекции бактерий

Наименование	Концентрация для селекции		Исходный раствор (мг/мл)	Растворитель
	<i>E. coli</i> (мкг/мл)	<i>A. tumefaciens</i> (мкг/мл)		
Ампициллин (Ap)	50,0	—	25,0	H ₂ O
Карбенициллин (Cb)	100,0	100,0	50,0	H ₂ O
Канамицин (Km)	100,0	100,0	100,0	H ₂ O
Рифампицин (Rf)	100,0	100,0	50,0	Метанол
Тетрациклин (Tc)	15,0	2,5	12,5	Этанол
Стрептомицин (Sm)	12,5	300,0	900,0	H ₂ O
Спектиномицин (Sp)	50,0	100,0	50,0	H ₂ O
Цефотаксим (Cx)	—	250,0	250,0	H ₂ O

Все водорастворимые антибиотики стерилизуют фильтрованием (размер пор фильтра 0,22 мкм), а затем хранят в виде замороженных исходных растворов при -20°C . Канамицин и карбенициллин относительно стабильны и часто могут сохраняться без разрушения до 1 мес при 4°C . Рифампицин и тетрациклин следует взвесить в стерильных пробирках и затем добавить необходимое количество метанола или этанола соответственно. После тщательного встряхивания антибиотики должны раствориться и также будут стерильны. Следует готовить такие количества растворов антибиотиков, которые вы собираетесь использовать в течение 2—3 нед. Кроме того, следует

отметить, что при комнатной или более высоких температурах и на свету многие антибиотики быстро разрушаются и теряют активность.

Антибиотики можно добавлять непосредственно в жидкую среду или в расплавленную и охлажденную (45—55°C) агаризованную твердую среду (см. разд. 1.3.5).

Литература

1. Albright L. M., Yanofsky M. F., Leroux B., Ma D., Nester E. W. (1987) Processing of the T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* generates border nicks and linear, single-stranded T-DNA. *J. Bact.* 169, 1046—55.
2. An G. (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79, 568—70.
3. An G. (1986) Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol.* 81, 86—91.
4. An G., Watson B. D., Stachel S., Gordon M. P., Nester E. W. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4, 277—84.
5. André D., Colau D., Schell J., Van Montagu M., Hernalsteens J. (1986) Gene tagging in plants by a T-DNA insertion mutagen that generates APH(3')II-plant gene fusions. *Mol. Gen. Genet.* 204, 512—18.
6. Ashby A. M., Watson M. D., Shaw C. H. (1987) A Ti plasmid determined function is responsible for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards the plant wound product acetosyringone. *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 189—92.
7. Beaty J. S., Powell G. K., Lica L., Regier D. A., MacDonald E. M. S., Hommes N. G., Morris R. O. (1986) *Tzs*, a nopaline Ti plasmid gene from *Agrobacterium tumefaciens* associated with *trans*-zeatin biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 203, 274—80.
8. Bevan M. W. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12, 8711—21.
9. Bevan M. W., Mason S. E., Goelet P. (1985) Expression of tobacco mosaic virus coat protein by cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. *EMBO J.* 4, 1921—6.
10. Birnboim H. C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513—23.
11. Boulnois G. (1987) *Gene Cloning and Analysis: A Laboratory Guide*. Blackwell, Scientific Publications, Oxford.
12. Byrne M. C., McDonnell R. E., Wright M., Carnes M. G. (1987) Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*—soybean interaction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8, 3—15.
13. Caplan A., Herrerra-Estrella L., Inze D., Van Haute E., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P. (1983) Introduction of genetic material into plant cells. *Science* 222, 815—21.
14. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria — Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110—14.
15. Debleare R., Bytebier B., De Greve H., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.* 13, 4777—88.
16. De Paolis A., Mauro M. L., Pomponi M., Cardarelli M., Sparo L., Costantino P. (1985) Localization of agropine-synthesizing functions in the T_R region of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plasmid* 13, 1—7.

17. Dhaese P., De Greve H., Decraemer H., Scell J., Van Montagu M. (1979) Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti-plasmids of *A. tumefaciens*. Nucl. Acids Res. 7, 1837—49.
18. Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D. R. (1980) Broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria — Construction of a gene bank of *Rhizobium melilotis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7347—51.
19. Douglas C. J., Staneloni R. J., Rubin R. A., Nester E. W. (1985) Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. J. Bact. 161, 850—60.
20. Fillatti J. J., Sellmer J., McCown B., Haissig B., Comai L. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206, 192—9.
21. Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Eichholtz D. A., Flick C. L., Hoffman N. L., Saunders P. R. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. Biotechnology 3, 629—35.
22. Gheysen G., Dhaese P., Van Montagu M., Schell J. (1985) DNA flux across genetic barriers: the crown gall phenomenon. In: Genetic Flux in Plants. Advances in Plant Gene Research, Vol. 2, pp. 11—47. Eds. Hohn B., Davies E. S., Springer Verlag.
23. Glover D. M. (1985) DNA Cloning Volume 1. A Practical Approach. IRL Press, Oxford.
24. Gronenborn B., Messing J. (1978) Methylation of single-stranded DNA *in vitro* introduces new restriction endonuclease cleavage sites. Nature 272, 375—7.
25. Gurlitz R. H. Z., Lamb P. W., Matthyse A. G. (1987) Involvement of carrot cell surface proteins in attachment of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 83, 546—68.
26. Hain R., Stabel P., Czernilofsky A. P., Steinbis H. H., Herrera-Estrella L., Schell J. (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. Mol. Gen. Genet. 199, 161—8.
27. Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M., Schell J. (1983) Chimaeric genes as selectable markers for plant cell transformation. EMBO J. 2, 987—95.
28. Hille J., Verheggen F., Roelvink P., Franssen H., Van Kammen A., Zabel P. (1986) Bleomycin resistance: a new dominant selectable marker for plant cell transformation. Plant Mol. Biol. 7, 171—6.
29. Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *A. tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303, 179—80.
30. Hoekema A., Hooykaas P. J., Schilperoort R. A. (1984) Transfer of octopine T-DNA segment to plant cells mediated by different types of *Agrobacterium* tumour- or root-inducing plasmids: generality of virulence systems. J. Bact. 158, 383—5.
31. Huffman G. A., White F. F., Gordon M. P., Nester E. W. (1984) Hairy root inducing plasmid: Physical map and homology to tumor inducing plasmids. J. Bact. 157, 269—76.
32. Jensen J. S., Marcker K. A., Otten L., Schell J. (1986) Nodule-specific expression of a chimeric soybean leghemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. Nature 321, 669—74.
33. Kahl G., Schell J. S. (1982) Molecular Biology of Plant Tumors. Academic Press, London.
34. Klee H. J., Yanofsky M. F., Nester E. W. (1985) Vectors for transformation of higher plants. Biotechnology 3, 637—42.
35. Komari T., Halperin W., Nester E. W. (1986) Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumour-inducing plasmid pTiBo542. J. Bact. 166, 88—94.

36. Koncz C., Schell J. (1986) The promoter of Ti-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383—96.
37. Lichtenstein C. (1986) A bizarre vegetal bestiality. *Nature* **332**, 682—3.
38. Mandel M., Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159—65.
39. Maniatis T., Fritsch F. F., Sambrook J. (1982) Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory.
40. Matzke A. J. M., Matzke M. A. (1986) A set of novel Ti plasmid-derived vectors for the production of transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **7**, 357—65.
41. Messing J., Vieira J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments. *Gene* **19**, 259—288.
42. Offringa I. A., Melchers L. S., Regensburg-Tuink A. J. G., Costantino P., Schilperoort R. A., Hooykaas P. J. J. (1986) Complementation of *Agrobacterium tumefaciens* tumor inducing auxin mutants by genes from the T_R region of the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6935—9.
43. Peralta E. G., Hellmiss R., Ream W. (1986) Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J.* **5**, 1137—42.
44. Sanders P. R., Winter J. A., Barnason A. R., Rogers S. G., Fraley R. T. (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1543—58.
45. Shah D. M., Horsch R. B., Klee H. J., Kishorer G. M., Winter J. A., Tumer N. E., Hironaka C. M., Sanders P. R., Gasser C. S., Aykent S., Siegel N. R., Rogers S. G., Fraley R. T. (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* **233**, 478—81.
46. Shahin E. A., Sukhapinda K., Simpson R. B., Spivey R. (1986) Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*; transgenic plants with normal phenotypes harbour binary vector T-DNA but no Ri plasmid T-DNA. *Theor. Appl. Genet.* **72**, 770—7.
47. Simoens C., Alliofe T. H., Mendel R., Muller A., Schiemann J., Van Lijsebetens M., Schell J., Van Montagu M., Inze D. (1986) A binary vector for transferring genomic libraries to plants. *Nucl. Acids Res.* **14**, 8073—90.
48. Simpson R. B., Spielmann A., Margossian L., McKnight T. D. (1986) A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*. Frequent co-transformation of two distinct T-DNAs. *Plant Mol. Biol.* **6**, 403—16.
49. Stachel S. E., Nester E. W., Zambryski P. C. (1986) A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 379—83.
50. Stachel S. E., Zambryski P. C. (1986) *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell. A novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. *Cell* **47**, 155—7.
51. Sukhapinda K., Spivey R., Simpson R. B., Shahin E. A. (1987) Transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) transformed with a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: non-chimeric origin of callus clone and low copy numbers of integrated T-DNA. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 491—7.
52. Tepfer D. (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium tumefaciens*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* **37**, 959—67.
53. Trulson A. J., Simpson R. B., Shahin E. A. (1986) Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 11—15.
54. Van den Elzen P. J. M., Townsend J., Lee K. L., Bedbrook J. R. (1985) A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **5**, 299—302.

55. Van Haute E., Joos H., Maes S., Warren G., Van Montagu M., Schell J. (1983) Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 2, 411—18.
56. Velten J., Schell J. (1985) Selection—expression plasmid vectors for use in genetic transformation of higher plants. Nucl. Acids Res. 13, 6981—98.
57. Vilaine F., Casse-Delbart F. (1987) Independent induction of transformed roots by the T_L and T_R regions of the Ri plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes*. Mol. Gen. Genet. 206, 17—23.
58. Wang K., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Zambryski P. (1984) Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. Cell 38, 455—62.
59. Winans S. C., Allenza P., Stachel S. E., McBride K. E., Nester E. W. (1987) Characterisation of the *vir* E operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. Nucl. Acids Res. 15, 825—37.
60. Yanofsky M. F., Porter S. G., Young C., Albright L. M., Gordon M. P., Nester E. W. (1986) The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. Cell 47, 471—7.
61. Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2, 2143—50.
62. Zhu J., Kempenaers W., Van der Straeten D., Contreras R., Fiers W. (1985) A method for fast and pure DNA elution from agarose gel by centrifugal filtration. Biotechnology 3, 1014—16.

Трансформация клеток двудольных растений с помощью Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и Ri-плазмид *A. rhizogenes*

Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Дж. Хэмил

2.1. Введение

С тех пор как в 1962 г. были впервые сконструированы неонкогенные векторы, системы генетической трансформации, основанные на использовании агробактерий и компонентов Ti- и Ri-плазмид, были разработаны для сравнительно небольшого числа видов растений. Большинство фундаментальных исследований по контролю экспрессии нормальных, модифицированных или химерных растительных генов в трансгенных растениях проводилось на *Nicotiana tabacum*. Это не случайность; данный факт отражает ту простоту, с которой можно осуществлять манипуляции в культуре табака для получения как эффективной генетической трансформации, так и, что более важно, регенерации трансформированных растений. Хотя у большинства двудольных растений при заражении некоторыми онкогенными штаммами агробактерий образуются опухоли, остается проблема селекции тканей, трансформированных неонкогенной T-ДНК, и еще большая проблема образования трансформированных побегов из таких тканей. Не следует забывать, что существует множество других подходов к проблеме переноса генов, особенно для однодольных растений, которые не основаны на использовании агробактерий, и эти подходы обсуждаются в гл. 3.

В настоящей главе мы надеемся дать представление о взаимодействии между агробактериями и растительными клетками, которое приводит к успешной трансформации. Предложенные методики различаются главным образом выбором векторной системы, типом эксплантата, методами селекции трансформированных тканей и регенерации трансформированных растений. В этой главе подробно описаны различные подходы к генетической трансформации растений векторами на основе агробактерий при использовании в качестве модельных систем табака, льна и моркови и рассмотрены главные факторы, которые необходимо учитывать при попытках адаптировать любую методи-

ку для использования на других растениях. В приложении 2[VIII] представлена специальная информация относительно генетической трансформации других видов растений с помощью векторных систем на основе агробактерий.

2.1.1. Основные свойства агробактерий и векторов, которые используются для трансформации клеток растений

О роли Ti-плазмид в возникновении заболевания «корончатый галл» и Ri-плазмид в индукции заболевания «косматый корень» мы уже упоминали в гл. 1. Индукция опухолей корончатых галлов и косматого корня на эксплантатах проростков и

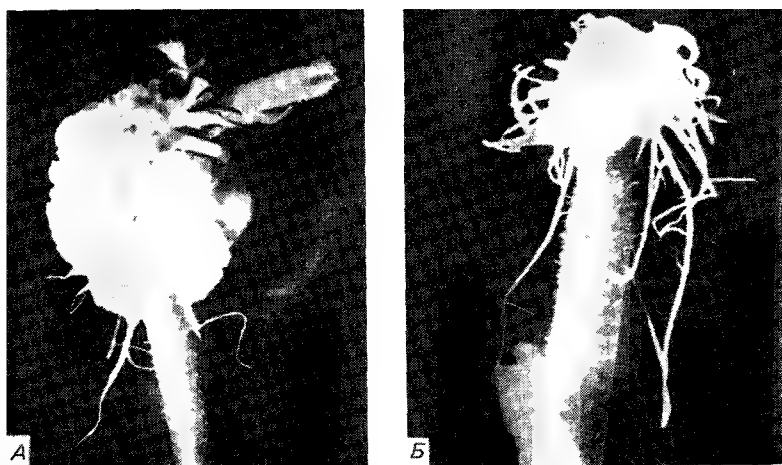


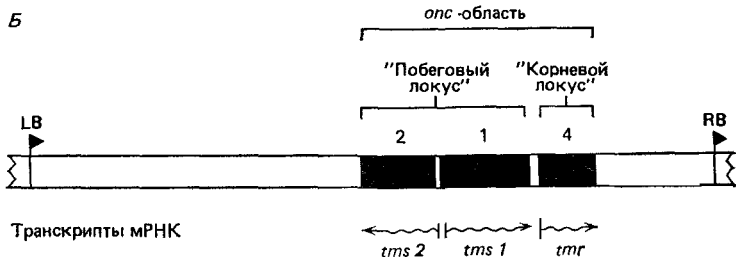
Рис. 2.1. Опухоли корончатого галла и косматого корня. Эксплантаты стебля табака инокулировали (А) возбудителем корончатых галлов *Agrobacterium tumefaciens* и (Б) бактерией, вызывающей заболевание косматого корня, *Agrobacterium rhizogenes*.

их стерильное культивирование после удаления агробактерий с помощью обработки антибиотиками остаются простейшим методом введения генов во многие двудольные растения. Это обусловлено тем, что на поверхности зараженного растения образуются опухоли (в случае заражения *A. rhizogenes* — на корнях) и злокачественные клетки легко распознать (рис. 2.1) и перевести эксплантаты в культуру *in vitro*. Опухоли корончатых галлов большей частью образованы трансформированными клетками, которые способны расти на питательной среде, не содержащей фитогормонов, и, следовательно, обогнать в росте любые нетрансформированные клетки, присутствующие в исходной опухоли. Однако онкогенные клетки корончатых галлов

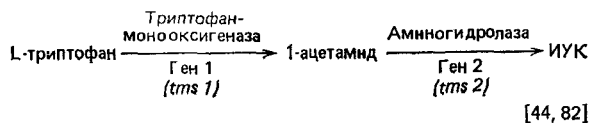
не способны регенерировать в целые трансформированные растения, и, таким образом, данный метод имеет ограниченное применение. С другой стороны, отдельные трансформированные корни, эксплантированные из опухолей косматого корня, имеют клональное происхождение и не содержат нетрансформированных клеток [60]. В противоположность корончатым галлам сообщалось об успешной регенерации побегов из опухолей косматого корня, а в некоторых случаях такие побеги развивались в зрелые растения [77, 55, 57, 46, 69, 78]. У этих трансформированных растений часто наблюдаются некоторые морфологические аномалии [77], такие, как скручивание листьев, пониженная апикальная доминантность, укороченные листья, измененная фертильность и потеря положительного геотропизма в большей части корневой системы. Причина утраты опухолевого фенотипа в настоящее время окончательно не установлена [77]. Прежде чем обсуждать различные подходы к трансформации растений с помощью агробактерий, необходимо дать некоторые более детальные представления о взаимодействиях между агробактериями и клетками растений в процессе нормального образования опухоли, а затем в общих чертах изложить историю получения систем трансформации на основе Ti и Ri-плазмид.

2.1.1.1. Онкогены Т-ДНК и регенерация растений из опухолей, индуцированных агробактериями

В течение последних нескольких лет гены Т-ДНК Ti-плазмид подробно изучались [2, 44]. Известно, что по крайней мере три из них кодируют ферменты, принимающие участие в конститутивном биосинтезе ауксина (*tms1* и *tms2*) и цитокинина (*tmr*), которые вызывают и поддерживают опухолевый рост (рис. 2.2, Б). Продолжающаяся продукция ауксинов и цитокининов в корончатых галлах приводит к подавлению регенерации побегов из опухолевых клеток; кроме того, секреция этих гормонов часто ингибирует регенерацию из соседних нетрансформированных клеток, часто присутствующих в опухолях. Инактивация как *tms1*, *tms2*, так и *tmr* (onc-генов) приводит к ослаблению онкогенности мутантной Ti-плазмиды. Штаммы агробактерий, несущие такие мутантные Ti-плазмиды, индуцируют корончатые галлы с измененным балансом гормонов. В результате у некоторых видов растений формируются мутантные опухоли «побегового» («shooty») типа (рис. 2.2, А), если инактивированы *tms1* или *tms2*. Аналогично, если инактивирован *tmr*, корончатые галлы могут формировать множество адвентивных корней [мутантные корончатые галлы «корневого» («gooty») типа, рис. 2.2, А]. Эти свойства были использова-



Возможный путь биосинтеза индолил-3-уксусной кислоты (ИУК)



Биосинтез цитокинина в ткани корнчатого галла

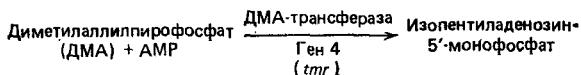


Рис. 2.2. Синтез фитогормонов в опухолях корнчатых галлов.

А. Морфология культивируемых *in vitro* опухолей табака, возникающих в результате заражения *Agrobacterium tumefaciens* дикого типа и мутантами по *опс*-генам. **а.** Опухоль дикого типа. **б.** Побеговый мутант, индуцированный штаммом *A. tumefaciens*, несущим мутацию в локусах Т-ДНК, кодирующих транскрипты 1 и/или 2 ($tms1$ и $tms2$). **в.** Опухоль корня, индуцированная штаммом *A. tumefaciens*, имеющим мутацию в локусе транскрипта 4 (tmr) Т-ДНК.

Б. Локализация *опс*-генов Т-ДНК *A. tumefaciens* и их участие в биосинтезе фитогормонов в опухолях корнчатых галлов. Флажки (LB и RB) обозначены последовательности границ Т-ДНК. (Воспроизведено из работы [2]).

ны в некоторых лабораториях для регенерации побегов из по-луонкогенных тканей «побеговых мутантов» [23]. Большинство таких побегов не трансформированы, поскольку многие из них возникают из нетрансформированных клеток, «перекрестно питаемых» цитокининами, секретируемыми соседними опухолевыми клетками. T_R T-ДНК Ri-плазмид содержит два гена, гомологичные *tms*-локусу Ti-плазмид, которые, по-видимому, обуславливают синтез ауксина в трансформированных клетках и индукцию косматого корня: Функции остальных локусов Ri-плазмиды, участвующих в метаболизме фитогормонов, и факторов, позволяющих проводить регенерацию растений из опухолей косматого корня у многих видов, менее изучены и более подробно обсуждаться не будут.

2.1.1.2. Взаимодействие агробактерий с клетками растения в участке поранения

Предполагаемое действие *vir*-генов Ti-плазмиды — обеспечение вырезания и переноса Т-ДНК из агробактерии в растительную клетку — обсуждалось в гл. 1 (разд. 1.1.4 и рис. 1.2). Взаимодействие *A. tumefaciens* с растительными клетками в участке поранения или культивируемыми клетками — процесс сложный, и детали механизма переноса и интеграции Т-ДНК, подобного конъюгации, еще не установлены [75]. Полагают, что начальный этап заключается в привлечении агробактерий к участкам поранения растений под влиянием градиента фенольных соединений [9]. Наиболее активен в этом отношении ацетосирингон, который интенсивно секретируется пораженными клетками [73]. Фенольные соединения ответственны за активацию *vir*-генов, и было показано, что очищенный ацетосирингон может индуцировать как экспрессию *vir*-гена, так и вырезание последовательности Т-ДНК в отсутствие растительных клеток [74]. Второй этап, как предполагают, заключается в прикреплении агробактерий к специфичным участкам узнавания на поверхности растительных клеток. Химическая природа рецепторной молекулы окончательно не установлена, однако последние данные позволяют предположить, что она — либо белок [51, 34], либо пектин [54]. Специфическое узнавание компонентов клеточной поверхности сопровождается интенсивным образованием агробактериями целлюлозных нитей (фибрилл). Показано, что образование фибрилл *in vitro* стимулируется любым материалом целлюлозной природы, присутствующим в среде. В результате этой неспецифичной продукции целлюлозы многие бактерии и растительные клетки упаковываются в сетку фибрилл, что приводит к образованию больших совместных агрегатов растительных клеток и бактерий. Бесцеллюлозные

мутанты агробактерий связываются с поверхностью растительных клеток значительно слабее [51], и, следовательно, роль целлюлозы скорее всего сводится к закреплению агробактерий на поверхности поврежденных растительных клеток перед переносом Т-ДНК.

2.1.2. Поведение культивируемых растительных клеток, влияющее на их трансформацию агробактериями

Поскольку цель большинства экспериментов по генетической трансформации заключается в получении целых, фертильных трансформированных растений, имеет смысл в общих чертах изложить основные особенности культивирования растительных тканей, которые влияют на выполнение поставленной задачи.

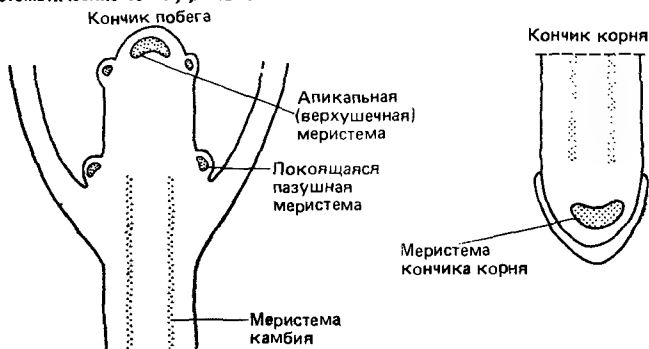
2.1.2.1. Возможное поведение растительных клеток в культуре

Многие типы растительных клеток, например **клетки зародыша** на относительно ранних стадиях его развития и покоящиеся (неделяющиеся) клетки паренхимы, меристем и сосудистых тканей камбия (рис. 2.3), находятся в состоянии, называемом *недетерминированным*. Другими словами, они способны различным образом дифференцироваться в зависимости от внешнего воздействия. Два простых примера — это ответ растения на повреждение, в процессе которого *недетерминированные* клетки, окружающие область раны, дифференцируются и, претерпевая быстрое клеточное деление, формируют дедифференцированный каллус с адвентивными (придаточными) корнями. Появление придаточных корней обычно наблюдается при размножении растений черенкованием. Напротив, клетки, перешагнувшие в своем развитии рубеж, на котором они уже определились как будущие клетки специализированного типа, например лигнифицированные сосудистые элементы ксилемы, ткани флоэмы и одревесневшие корковые клетки, не способны к передифференцировке и достигли так называемого *детерминированного* состояния.

Рисунок 2.4 иллюстрирует три основных типа роста эксплантатов в культуре.

А. Переход к дедифференциации *недетерминированных* клеток эксплантата и рост в виде каллуса. Сюда можно отнести и образование клеточных колоний и каллуса из протопластов или изолированных растительных клеток. Такие *недифференцированные* ткани могут стабилизироваться в жидких суспензионных культурах и расти неопределенно долго. Из *недифференцированных* тканей многих видов можно регене-

А. Меристематические зоны у растений



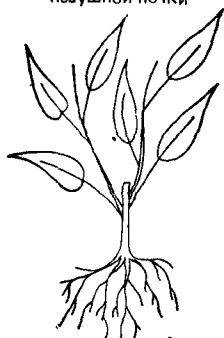
Б. Пластическое развитие у растений

Раневой ответ



Развитие органов

а) Развитие пазушной почки



б) Развитие бокового корня

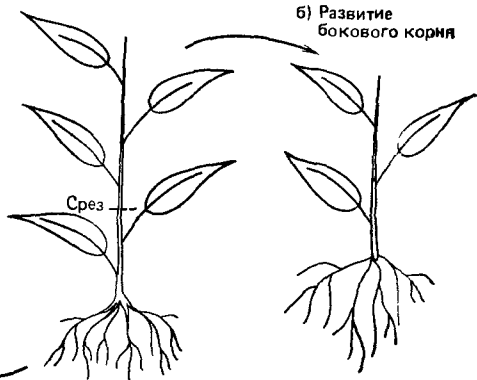
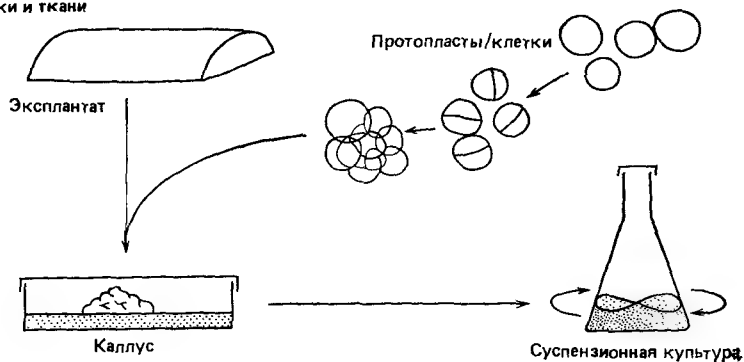


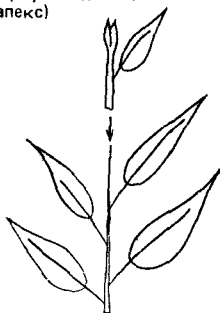
Рис. 2.3. Нормальные меристематические зоны и пластическое развитие у растений.

А Недифференцированные клетки и ткани

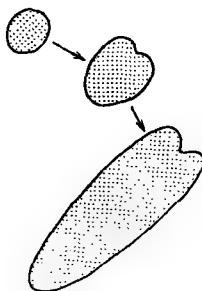


Б Развитие уже существующих органов

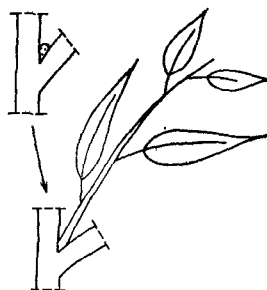
а) Верхушка побега (апекс)



б) Зародыши

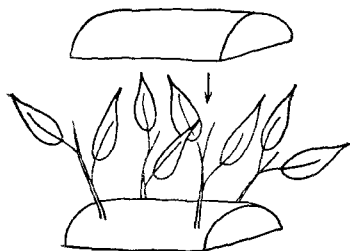


в) Пазушные почки



Б Развитие адвентивных органов

а) Корни



б) Побеги

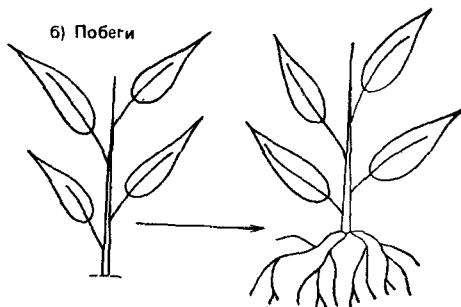


Рис. 2.4. Основные типы роста эксплантатов растений в культуре.

рировать целые растения либо путем органогенеза (индукция побегов), либо путем эмбриогенеза.

- Б.** Продолжающийся рост из предсуществующих меристем, включая а) непрерывный рост органов, таких, как корни и побеги, в виде полностью дифференцированных структур, содержащих детерминированные клетки, б) продолжающееся нормальное развитие незрелых структур, таких, как эмбрионы на ранней стадии, и в) развитие покоящихся побочных примордиальных почек в побеги.
- В.** Инициация и развитие примордиев дополнительных органов непосредственно из клеток эксплантата без промежуточной стадии каллуса.

2.1.2.2. Компетентность растительных клеток для трансформации векторами на основе агробактерий

Индукция корончатого галла и косматого корня агробактериями обычно происходит в участках поранения, и растительные клетки, как полагают, компетентны для трансформации только в течение короткого промежутка времени, вероятно, соответствующего S-фазе клеточного цикла, когда происходит репликация генома [52]. Поранение может привести к следующим последствиям: 1) обеспечить бактериям доступ к участкам узнавания на поверхности клеток, 2) стимулировать связанное с раневым ответом деление клеток, обеспечивающее компетентность растительных клеток для трансформации, и 3) стимулировать продукцию образующихся в ране соединений, например ацетосирингона, которые привлекают агробактерии и активируют *vir*-гены, необходимые для переноса Т-ДНК. Таким образом, для достижения трансформации клетки растения должны находиться в S-фазе и быть легкодоступны для вирулентных агробактерий (рис. 2.3). Особенно важно отметить, что зачатки многих органов в сложных эксплантатах, таких, как сегменты гипокотилей и стебля, часто развиваются из покоящихся меристем или специфичных тканей, глубоко запрятанных под несколько слоев клеток эксплантата (см. гипокотиль льна на рис. 2.11, В). Хотя такие клетки способны к регенерации в побеги, их расположение может препятствовать контакту с агробактериями и, следовательно, трансформации.

2.1.3. Селекция трансформированных тканей и регенерация растений

2.1.3.1. Трансформированные клетки, индуцируемые штаммами агробактерий, несущими Ti- и Ri-плазмиды дикого типа

Вырезание трансформированной ткани из опухолей корончатых галлов или косматого корня — относительно простая операция, поскольку злокачественные клетки образуют нарост на

поверхности эксплантата. Большинство исследований показывает, что трансформированные клетки корончатых галлов происходят из одной или нескольких первоначально трансформированных компетентных клеток в области раны. Нетрансформированные клетки, обнаруживаемые в опухолях корончатых галлов, поддерживаются, как считают, за счет «перекрестного питания» фитогормонами от опухолевых клеток [63, 56]. Известно, что индивидуальные корешки из опухоли косматого корня имеют клональное происхождение [20, 60]. Ауксины, которые секретируются корнями, трансформированными Ri-плазмидой, тоже стимулируют развитие корней из неонкогенных клеток, присутствующих в месте поранения или в эксплантатах опухолей косматого корня [15]. Число этих клеток зависит от вида растений и типа эксплантата.

2.1.3.2. Селективные и скринируемые маркерные гены

В современных Ti-плазмидных векторных системах, таких, как pBin 19/pAL4404 и pGV3850::1103 (гл. 1), *опс*-гены замещены на гены резистентности к антибиотикам и гербицидам (табл. 2.1) в качестве доминантных селективных маркеров трансформации. Эти и многие другие аналогичные векторы известны как неонкогенные или «разоруженные». В них сохранены только повторы длиной 25 п. н. из T-ДНК и иногда ген опин-синтазы из T-ДНК Ti-плазмиды дикого типа; такие векторы не индуцируют опухолевый рост у эксплантатов. Скрининг трансформированных тканей может быть очень утомителен, хотя доказано, что в некоторых случаях он полезен. В настоящее время известно большое разнообразие скринируемых генов (табл. 2.1).

Селективные маркерные гены

Примеры векторных систем, содержащих разнообразные селективные маркерные гены, обсуждались в гл. 1, а используемые в настоящее время селективные фенотипы представлены в табл. 2.1. Хотя можно предположить, что маркерные гены эффективно экспрессируются у большинства, если не у всех видов растений, следует проявлять осторожность в выборе маркерного гена, поскольку различные виды растений чрезвычайно варьируют по признаку чувствительности к селективным агентам. Например, устойчивость к канамицину успешно использовалась в качестве селективного фенотипа при трансформации различных видов растений (приложение 2 [VIII]), но в отношении других видов растений канамицин иногда неэффективен. Это обусловлено либо толерантностью к высоким уровням этого соединения, либо гиперчувствительностью, приводящей к массово-

му некрозу растительной ткани на селективных чашках. Другие селективные маркерные гены, приведенные в табл. 2.1, не нашли широкого применения либо в результате недостаточной надежности методик проведения селекции (гены устойчивости к метотрексату и хлорамфениколу), либо потому, что это более поздние конструкции и, вследствие этого, очень мало известно относительно возможности их широкого использования, кроме стандартных систем культуры ткани, таких, как табак и петуния (гены резистентности к гиромоцину, блеомицину и глифосату).

Селективный агент, чтобы быть полезным, должен создавать сильное селективное давление в отношении рассматриваемой ткани растения. Эффективность отдельных соединений как селективных агентов способна меняться в зависимости от типа выбранного эксплантата или селективируемой ткани. Например, уровень дифференциации, тип и размер эксплантата, подвергаемого давлению селективной среды (протопласт, клетка, колония клеток, суспензионный агрегат клеток, клетки суспензии, вступившие в эмбриогенез, быстро растущие изолированные каллусы, регенерирующий каллус, каллус, прикрепленный к эксплантату, изолированный побег, побег, прикрепленный к эксплантату или каллусу, корень, эмбрион, проросток), — все это влияет на применимость любого селективного маркерного гена в каждом конкретном случае. Нельзя предполагать, что фенотип, представляющий собой хороший селективный маркер для какой-либо ткани одного вида растения, будет столь же эффективен для других разновидностей (и даже для других эксплантатов) того же вида.

Скринируемые маркерные гены

Скринируемые маркерные гены целесообразно использовать в тех случаях, когда частота трансформации высока, а трансформированные ткани в основном имеют клональное происхождение; примерами могут служить трансформированные побеги, корни и колонии, полученные из высеваемых с низкой плотностью протопластов и, по-видимому, развившиеся из отдельных трансформированных клеток. При использовании скринируемых маркеров важные факторы — это простота, дешевизна и специфичность методов детектирования. Современные методы анализа для наиболее часто используемых скринируемых маркеров (хлорамфениколацетилтрансфераза, октопин- и нопалинсинтаза, агропин, β -глюкуронидаза, β -галактозидаза и люцифераза) относительно дешевы и просты в осуществлении (табл. 2.1). Однако некоторые грубые тканевые экстракты могут содержать соединения, которые затрудняют интерпретацию результатов или обладают неспецифической активностью, имити-

Селективные маркерные гены Фермент (сокращенное обозначение)	Субстраты (селективные агенты)	Чувствительность ткани контрольно- го растения (мкг/мл) ¹⁾	Конструкции	Уровень устойчи- вости, обеспечи- ваемые различны- ми конструкциями (мкг/мл)
Неомицинфосфотрансфераза II (NPT II)	Неомицин Канамицин G418	50—250 5—35 3—10	nos- <i>npt-II</i> /nos poly(A) ²⁾ nos- <i>npt-II</i> /nos poly(A) ³⁾ CaMV-35S- <i>npt-II</i> /nos poly(A) ⁴⁾	75—100 Км 300—1000 Км 500—2000 Км
Гигромицинфосфотрансфераза (HPT)	Гигромицин-В	3—10	nos- <i>hpt</i> /nos poly(A) ⁵⁾ CaMV-19S- <i>hpt</i> /nos poly(A) ⁶⁾	50—100 Нм 30—50 Нм
Ген устойчивости к блеомици- ну (BLE) ⁷⁾	Блеомицин	1—5	CaMV-35S- <i>ble</i> /nos poly(A) ⁶⁾	5—10 В1
Дигидрофолатредуктаза (DHFR Mtr)	Метотрексат Триметоприм	0,01—0,5 8—16	nos-DHFR/nos poly(A) ⁸⁾	0,05—0,5 Мт
5-Енолпирувилшикимат-3-фос- фатсинтаза (EPSPS)	Глифосат	<0,1 мМ	CaMV-35S-EPSPS/nos poly(A) ⁹⁾	>5 мМ глифосата

(Скринируемые маркеры) и анализ Фермент (сокращенное обозначение)	Обычные субстраты	Метод анализа	Комментарии
Хлорамфениколацетил- трансфераза ¹⁰⁾ (CAT) ¹¹⁾	[¹⁴ C] Хлорамфеникол + + ацетил-КоА	Используют грубые раститель- ные экстракты и ТСХ для раз- деления ацетилированного и неацетилированного [¹⁴ C]-хлорамфеникола. Оп- ределение путем автора- диографии	Очень чувствителен — количествен- ные результаты при малом коли- честве ткани. У некоторых видов наблюдается низкий уровень эн- догенного ацетилирования Сп

Нопалинсинтаза ¹²⁾ (Nos)	Аргинин+ α -кетоглутаровая кислота	Инкубируют ткань в среде, содержащей оба субстрата. Грубый экстракт анализируют с помощью электрофореза на бумаге и определяют нопалин путем флуоресцентного окрашивания	Очень чувствительный флуоресцентный краситель (фенантренхинон). Для анализа достаточно 50 мг ткани. Неопиновые соединения, случайно мигрирующие вместе, тоже окрашиваются и могут затруднять анализ
Октописинтаза ¹²⁾ (Ocs)	Аргин+пируват	Так же, как нопалин	Ocs менее активна, чем Nos, и по этому дает более слабый сигнал
Агропин ¹³⁾	—	Анализ с помощью электрофореза на бумаге. Для определения агропина используют метод окрашивания серебром	Агропин в норме присутствует в больших количествах, что допускает прямое определение в грубых экстрактах. Быстрый и простой метод
β -Галактозидаза ¹⁴⁾ (Lac Z)	ONPG (о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид) X-GAL	Колориметрический анализ активности фермента в растительных экстрактах. Используют для анализа <i>in vivo</i> культивируемых растительных клеток	Достаточно легкие методы экстракции для анализа <i>in vitro</i> и простые для анализа <i>in vivo</i> . Однако интерпретация результата иногда затруднительна из-за присутствия эндогенной β -галактозидазы у многих растений
β -Глюкуронидаза ¹⁵⁾ (6US)	Ряд субстратов в зависимости от теста	Колориметрические, флуоресцентные и гистохимические	Разработан ряд чувствительных, количественных методик определе-

Скринируемые маркеры и анализ Фермент (сокращенное обозначение)	Обычные субстраты	Метод анализа	Комментарии
Люцифераза ¹⁶⁾ (бактериальная <i>lux</i>)	Деканал + FMNH ₂	Биолюминесцентные анализы in vitro и in vivo	Анализ количественный и быстрый, однако требуется флуориметр. Не сообщалось об интерферирующих активностях. Функционально активный фермент состоит из двух различных полипептидов
Люцифераза ¹⁷⁾ (светляка)	АТФ + O ₂ + люциферин	Биолюминесцентные анализы in vitro и in vivo	Люцифераза насекомых состоит из одного полипептида и, следовательно, представляет более простой объект для генной инженерии. Анализ такой же, как описан выше

¹⁾ Только примерный диапазон, основывающийся главным образом на уровнях, которые ингибируют рост каллуса и/или регенерацию побегов *N. tabacum*.

²⁾ [13, 29, 37].

³⁾ [11, 30, 72].

⁴⁾ [64].

⁵⁾ [80].

⁶⁾ [48].

⁷⁾ До сих пор неизвестна ферментативная функция, связанная с резистентностью к блеомицину. Неизвестна и функция соответствующего гена.

⁸⁾ [37].

⁹⁾ [66].

¹⁰⁾ [38].

¹¹⁾ В некоторых случаях САТ использовалась как селективный маркер. Показано, что хлорамфеникол представляет собой слабый селективный агент для каллуса, но существенно ингибирует рост корней и вызывает побеление культивируемых побегов и проростков.

¹²⁾ [1].

¹³⁾ [60].

¹⁴⁾ [36].

¹⁵⁾ [45].

¹⁶⁾ [47].

¹⁷⁾ [58].

ТСХ — тонкослойная хроматография.

руют активность анализируемого фермента, конкурируют за те же кофакторы, субстраты и т. д. и, таким образом, делают анализ ненадежным. Следовательно, важно проконтролировать все эти факторы, прежде чем использовать какой-либо маркерный ген для скрининга.

Особый случай представляет использование генов-«репортеров» — индикаторных генов. Их применяют при разработке систем трансформации для «транзиторной» или кратковременной («*transient*») экспрессии, при предварительном анализе конструируемых векторов (гл. 3) и тестировании последовательностей ДНК, способных регулировать экспрессию генов в стабильно трансформированных тканях (гл. 6).

2.1.3.3. Использование неонкогенных плазмид в качестве *vir*-помощников

Селекцию растительных клеток, трансформированных неонкогенными векторами, на фоне нетрансформированных клеток можно осуществить по их способности расти на питательной среде, содержащей антибиотики, в норме токсичные для таких клеток. Из подобных резистентных к антибиотикам тканей можно регенерировать нормальные побеги с помощью стандартных методов культуры тканей. Однако при попытках трансформировать растительные клетки неонкогенными векторными системами на основе Ti- или Ri-плазмид перед исследователем встает следующая проблема. В отличие от индукции корончатого галла или косматого корня неонкогенные трансформированные растительные клетки необходимо снабдить ростовой средой строго определенного состава, содержащей правильное соотношение фитогормонов. Такие среды специально подбирают для конкретных видов (или даже сортов) растений, чтобы поддержать образование каллуса после непродолжительного деления клеток в ответ на поранение. Обычно пораженную ткань культивируют *in vitro* — с этим подходом связаны различные проблемы, имеющие отношение к селекции трансформированных клеток:

1. Культуральная среда стимулирует рост и нетрансформированных клеток, которые и так составляют большинство.
2. Для подавления роста агробактерий необходимо использовать антибиотики, которые могут ослаблять рост и регенеративную способность культивируемых клеток.
3. Во многих случаях необходимо обеспечить деление редких трансформированных клеток в месте поранения до того, как начнет действовать селекция, иначе токсичные продукты, образующиеся при некрозе соседних нетрансформированных клеток, могут оказаться губительными.

2.1.3.4. Использование онкогенных *vir*-хелперных плазмид

Недавно различными группами исследователей была продемонстрирована высокая частота котрансформации (одновременной трансформации) онкогенной Т-ДНК из Ti- или Ri-плазмиды дикого типа и неонкогенной Т-ДНК бинарного вектора, когда обе плазмиды локализуются в одной и той же клетке *Agrobacterium* [5, 35, 72]. Основываясь на этих данных, было показано, что штаммы *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*, несущие бинарные векторы, могут индуцировать опухоли, в которых обнаруживаются клетки, содержащие Т-ДНК обоих или одного типа, что позволяло регенерировать из подобных тканей достаточное число резистентных к антибиотику неонкогенных растений [7, 21, 27, 69]. Данный подход часто обеспечивает высокую частоту трансформации клеток, в особенности когда в качестве *vir*-помощника используют супервирулентные штаммы [7, 21]. Выросты из резистентных к антибиотику опухолей косматого корня часто содержат множество неонкогенных корней [15]. В таких опухолях растения, регенерирующие из корневых клонов и содержащие только неонкогенную Т-ДНК, можно отбирать по их резистентности к соответствующим антибиотикам и по нормальной морфологии [69, 78]. Использование штаммов *A. rhizogenes* дикого типа в качестве *vir*-помощников облегчает, таким образом, узнавание трансформированных тканей.

Регенерация из неонкогенных клеток в большинстве опухолей корончатых галлов в норме репрессирована действием гормонов, секретируемых онкогенными клетками. Однако недавно показано, что эффективной индукции корончатых галлов может способствовать использование в качестве *vir*-помощников определенных нопалиновых штаммов *A. tumefaciens*, о которых известно, что они секретируют *транс*-зеатин [15]. Локус *транс*-зеатина (*tzs*) расположен у границы *vir*-области, и хотя он не обязателен для переноса Т-ДНК, *транс*-зеатин увеличивает частоту индукции опухолей, воздействуя на растительные клетки [2]. Кроме того, полагают, что секреция цитокининов агробактериями важна для управления процессом регенерации из корончатых галлов, индуцированных на некоторых видах растений [27].

В дополнение к этим наблюдениям показано, что два сцепленных сегмента Т-ДНК, присутствующие в одной и той же трансформированной клетке, сегрегируют в F₁-поколении [22, 60]. Таким образом, если даже большинство морфологически аномальных растений, регенерированных из культуры косматого корня или опухолей побегового типа, содержат онкогенную Т-ДНК при условии, что неонкогенная Т-ДНК не присутствует в той же хромосоме, что и Т-ДНК бинарного вектора,

эти локусы сегрегируют в F_1 -поколении, что позволяет получить полностью неонкогенные трансформированные растения.

Таким образом, выработано несколько стратегий трансформации сохранения жизнеспособности тканей, получаемых клонально из трансформированных клеток, и обеспечения их селекции на основе устойчивости к антибиотикам (рис. 2.5). Цель подробно описанных в этой главе практических примеров заключается в знакомстве исследователя с некоторыми из основных методов; будут изложены основные соображения о том, какие подходы можно использовать для трансформации того или иного растения.

2.1.4. Основные методы трансформации растительных клеток с помощью агробактериальных векторов

В пределах конкретных видов для многих приложений генетической инженерии растений важно идентифицировать культивируемые растительные клетки, которые как компетентны для трансформации, так и способны регенерировать в целые растения. Эксплантаты могут варьировать по сложности от изолированных протопластов до целых проростков или фрагментов зрелых органов (рис. 2.6). Исходя из предположения, что поверхность по крайней мере некоторых клеток эксплантатов двудольных растений доступна для контакта с агробактериями и эти клетки способны делиться *in vitro*, при разработке системы трансформации нового растения прежде всего надо рассмотреть возможность воспроизводимой регенерации данных растений. Многое зависит от эмпирического опыта подбора подходящей среды для регенерации побегов. Однако нельзя не учитывать основную анатомию, физиологию и характер развития выбранного растения при идентификации подходящих эксплантатов для культуры ткани, которые на какой-то стадии перейдут к регенерации побегов. Без этих фундаментальных знаний поведение эксплантатов будет непредсказуемым и, следовательно, обострит любые проблемы, связанные с идентификацией, возможно, редких трансформированных тканей. Например, общие внешние условия роста донорного растения, размер эксплантата и онтогенез выбранного в качестве источника органа часто определяют последующее поведение в культуре ткани.

В больших гетерогенных эксплантатах, например сегментах листа, обычно только клетки определенных областей в ответ на воздействие ростовой среды переходят к делению и/или формированию зачатка органа. Часто на обширных участках эксплантата наблюдается слабый ростовой ответ, а вместо этого происходит разрушение хлорофилла, почернение (обычно вызываемое продукцией полифенольных соединений) или разбуха-

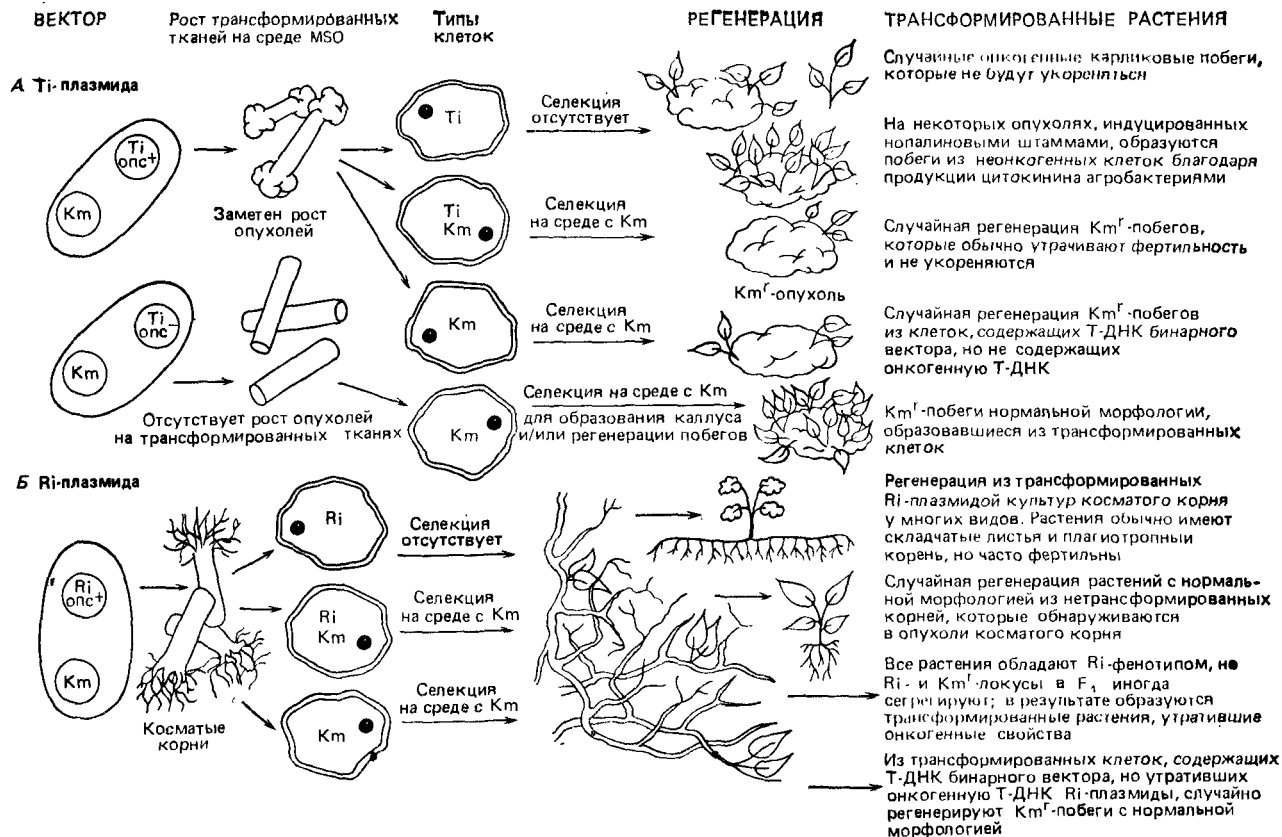


Рис. 2.5. Стратегии трансформации растений бинарными векторами совместно с онкогенными и неонкогенными Ti- и Ri-плазмидами в качестве *vir*-помощников.

ние клеток, что сильно увеличивает размер эксплантата. Эти три основных типа ответа часто оказывают ингибирующее действие на трансформацию. Однако важно осознавать, что присутствие исходного материала донорного растения, вероятно в результате эндогенных уровней гормонов или особого типа физиологии эксплантата, часто оказывает драматическое воздействие на клетки, начавшие интенсивно делиться в ответ на культивирование. Например, у многих видов с высокой частотой удастся индуцировать зачаток органа непосредственно из свежих эксплантатов тканей или каллуса, все еще находящегося в контакте с исходным эксплантатом, тогда как устоявшийся каллус, изолированный от таких эксплантатов, может потерять способность к регенерации побегов даже после одного пассажа.

Регенерация обычно с трудом происходит из трансформированных недифференцированных тканей, полученных из культивируемых более нескольких месяцев клеток суспензии, а еще с большим трудом из каллусов, полученных из протопластов [3, 28]. Таким образом, прежде чем осуществлять трансформацию любой разновидности растений, чрезвычайно важно определить наиболее чувствительный эксплантат. Для многих культурных видов главной трудностью остается трансформация клеток, способных регенерировать побеги («органогенез») или способных к эмбриогенезу, и поэтому большинство методов разработано в результате экспериментов на модельных системах культуры тканей, таких, как табак и петуния. Для ясности большинство из рассматриваемых ниже методик основано на использовании именно таких модельных систем. В целом все основные манипуляции с культурой ткани должны быть действенными для успешной разработки системы трансформации конкретных видов растений. Информация относительно культивирования тканей многих видов содержится в следующих литературных источниках [4, 24, 25, 26, 70, 83].

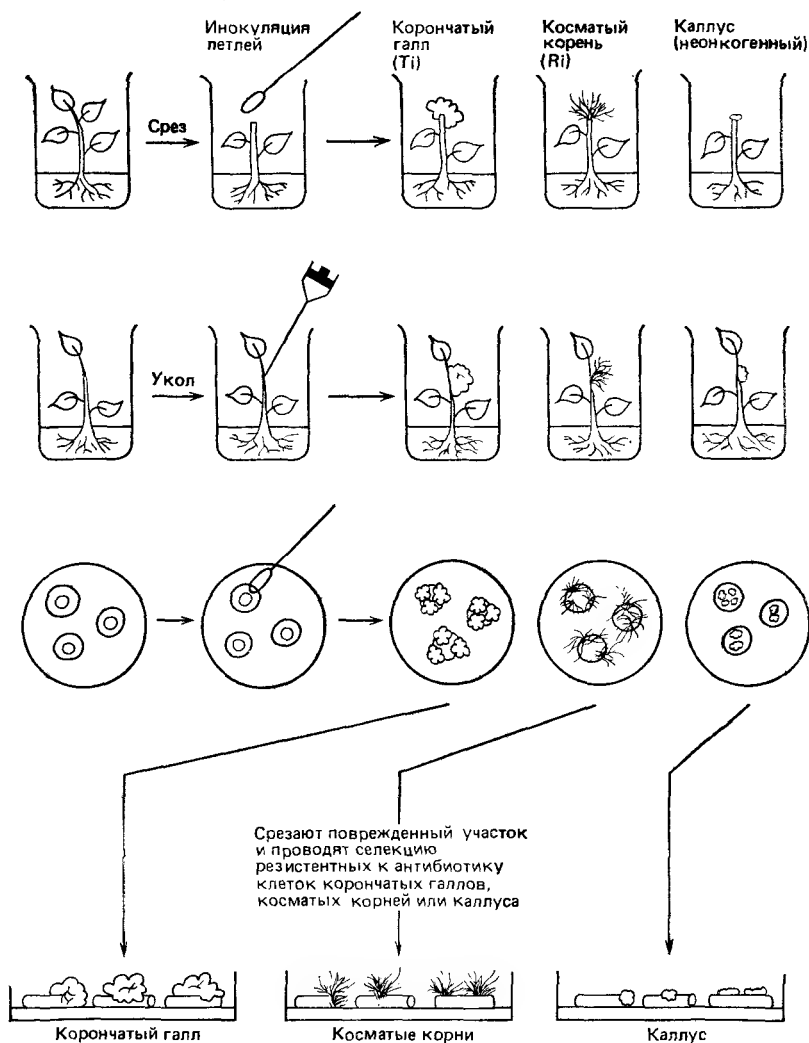
2.2. Трансформация с помощью онкогенных штаммов дикого типа *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*

2.2.1. Основные положения

Индукция корончатых галлов может быть достигнута во всех случаях, когда Ti-плазмида содержит *vir*- и *onc*-гены, а индукция косматого корня — при использовании штаммов *A. rhizogenes* дикого типа, содержащих Ri-плазмиды. Как мы уже упоминали во введении к гл. 1, некоторые штаммы агробактерий более вирулентны по отношению к эксплантатам одних видов растений, чем других; это может зависеть от *vir*-

А Большие эксплантаты

например, выращенные в теплице проростки;
размножаемые *in vitro* растения;
засажающие органы зрелых растений



функций или областей Ti-плазмиды вне T-ДНК или от хромосомного фона хозяйского штамма агробактерий. Только эмпирически можно определить, удачна ли соответствующая комбинация этих факторов для данного типа эксплантата конкретного сорта растения.

Б Небольшие эксплантаты

например, эксплантаты из стерильных проростков,
размножаемых *in vitro* растений
и выращенного в теплице материала

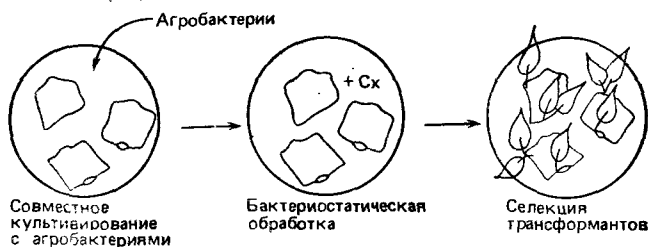
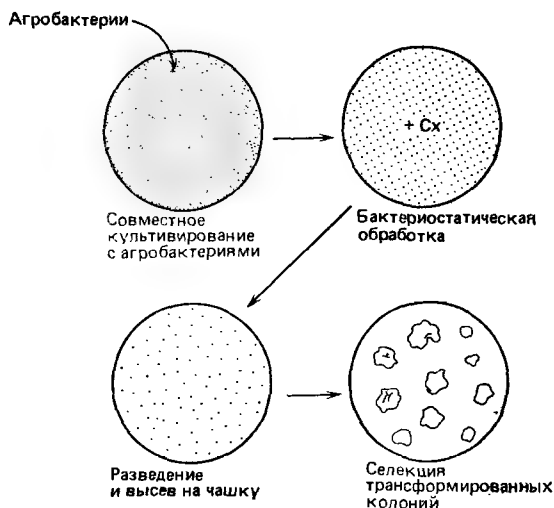
**В Культуры клеток/сuspensions**

Рис. 2.6. Основные способы трансформации растительных клеток векторами на основе агробактерий.

Обычно цель состоит в инокуляции участка поранения, который физически отделен от питательной среды так, что бактерии не контаминируют культуру, либо в инокуляции эксплантатов на твердой или в жидкой среде небольшим количеством агробактерий с последующим переносом инокулированных эксплантатов на среды, содержащие бактериостатические антибиотики (рис. 2.6). Первый подход позволяет проводить трансформацию без включения в питательную среду антибиотиков, которые могут повлиять на рост эксплантата, а также сводит к минимуму образование каллуса вокруг раны. Кроме того, он

способствует выживанию агробактерий во время развития опухоли в месте поранения; в этой ситуации любые гормоны, секретируемые отдельными штаммами, могут влиять на компетентность растительных клеток и органогенез.

Для большинства видов наиболее подходящим материалом для индукции опухоли служат стерильные проростки или размножаемые *in vitro* растения. Очень важно использовать стерильный растительный материал, чтобы избежать контаминации трансформированной растительной ткани посторонними микроорганизмами. Такие загрязнения, если их не контролировать с помощью антибиотиков, инфицируют культуральную среду и могут привести к гибели растительных клеток. Кроме того, они способны исказить результаты любых биохимических или молекулярных исследований, проводимых на трансформированном материале. Если семена или размножаемые *in vitro* растения недоступны, тогда в отдельных случаях следует инокулировать растения *in vivo*, а также стерилизовать ткань корончатого галла или косматого корня и перенести ее в культуру. В других случаях для индукции опухоли *in vitro* можно использовать поверхностно стерилизованные эксплантаты материала, растущего в теплице, при условии, что стерильность эксплантатов строго контролируется.

Подходящими эксплантатами считаются целые стерильные проростки, эксплантаты проростков (например, гипокотили, семядоли, листья и корни), эксплантаты выращенной в теплице рассады, более зрелые или размножаемые *in vitro* растения (например, корень, стебель, лист, черешок, фрагменты цветковых и запасующих органов). Состав используемых сред в какой-то мере зависит от вида растения и типа эксплантата. Например, для роста проростков или эксплантатов побегов может подойти среда, используемая для поддержания культуры побегов того же вида растения. С другой стороны, фрагменты запасующих тканей (клубней, главных корней) часто сохраняют жизнеспособность в течение нескольких недель при культивировании на агаризованной среде, содержащей только неорганические соли. У большинства видов растений корончатые галлы или косматые корни развиваются на больших эксплантатах, культивируемых на простых средах, не содержащих фитогормонов. Главное требование к ростовой среде, используемой при трансформации и развитии опухоли, заключается в том, чтобы она обеспечивала жизнеспособность эксплантата при ограниченном образовании каллуса. При использовании небольших эксплантатов в состав среды можно включить и микродобавки ростовых веществ, чтобы сохранить эксплантат и обеспечить ограниченное деление окружающих рану клеток во время инкубации с агробактериями. Проблему выживаемости эксплантата можно решить,

помещая в среду большое количество небольших эксплантатов, чтобы поддерживать высокую плотность инокулируемого растительного материала. Следует подчеркнуть, что большинство тканей корончатых галлов и косматого корня после срезания с поверхности эксплантатов способны расти на простых средах, часто не содержащих фитогормонов и содержащих антибиотики, которые инактивируют бактериальные, но не растительные клетки (приложение 2[III]). Таким образом, для спасения трансформантов редко требуются сложные среды, что оставляет достаточно возможностей для эмпирического подбора сред.

Поскольку физиологически и морфологически нормальные растения невозможно регенерировать из онкогенных клеток корончатых галлов, большинство современных векторов на основе Ti-плазмид неонкогенны. Как упоминалось выше, главная особенность онкогенных систем трансформации с помощью агробактерий состоит в том, что галлы и косматые корни вырастают из эксплантатов, и, следовательно, трансформированные клетки легко отличить. Это очень важное свойство, поскольку трансформация эксплантатов с помощью неонкогенных векторов часто не позволяет отобрать резистентные к антибиотикку ткани на фоне нетрансформированных клеток. Таким образом, онкогенные векторы, которые к тому же несут гены устойчивости к антибиотикам [38, 39], очень полезны для быстрого подбора наилучших эксплантатов и методик инокуляции, чтобы получить оптимальную трансформацию. Индукция «микроопухолей» в местах поранения с большой площадью поверхности, таких, как срезы клубня или главного корня (рис. 2.7), тоже представляет собой удобный способ получения нескольких тысяч легко отличимых, независимых трансформантов.

Ситуация слегка отличается при использовании Ri-плазмид *A. rhizogenes*, поскольку у некоторых видов можно регенерировать трансформированные побеги из культивируемых косматых корней [77, 55, 57, 46, 69]. Точно так же оказалось возможным регенерировать трансформированные побеги внешне нормального вида из некоторых «полуонкогенных» корончатых галлов, индуцированных агробактериями, несущими «побеговые» мутанты Ti-плазмид [23], а также в некоторых случаях из корончатых галлов дикого типа, когда индуцирующий штамм агробактерий секретировал большое количество цитокининов [27]. Как подчеркивалось в общем введении к данной главе (разд. 2.1.3.4), в последнее время в различных источниках описана регенерация неонкогенных, устойчивых к антибиотикку побегов из опухолей, при индукции которых в качестве *vir*-помощника для бинарного вектора использовали онкогенные Ti- или Ri-плазмиды дикого типа, хотя пока не ясно, насколько широко будет распространено это явление.

Цель последующих экспериментов заключается, во-первых, в определении локализации в эксплантатах клеток, которые переходят к делению, связанному с раневым ответом, и подтверждении того, что подобные клетки могут находиться в состоянии компетентности для трансформации, и, во-вторых, в изучении влияния эксплантата и штамма агробактерий на образование опухолей корончатого галла и косматого корня. Такие эксперименты можно проводить на любом эксплантате выбранного вида растений, а не только в описанных ниже условиях.

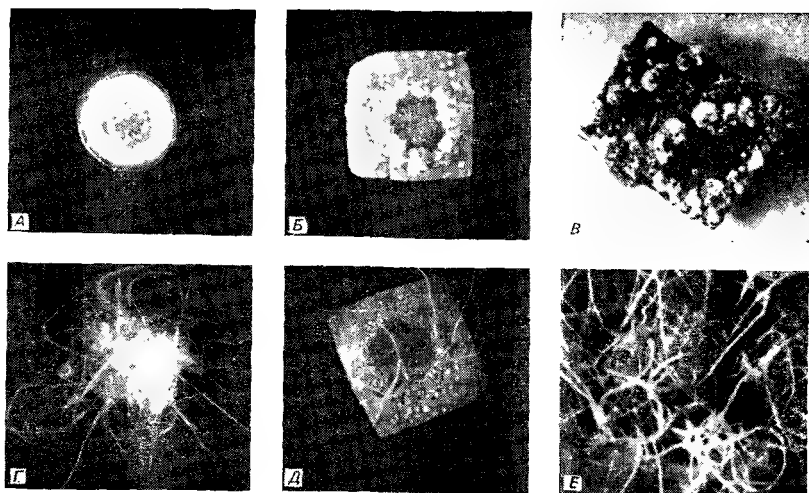


Рис. 2.7. Индукция опухолей *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* на эксплантатах запасующих органов. Показаны эксплантаты через три недели после инокуляции. А. Морковь × неонкогенный штамм *A. tumefaciens* C58C1 (pGV3850). Б. Морковь × онкогенный штамм непалинового типа *A. tumefaciens* pTiB6S3 : : pMON200. В. Свекла × pTiB6C3 : : pMON200. Г. Картофель × штамм *A. rhizogenes* дикого типа A4. Д. Морковь × *A. rhizogenes* штамм A4. Е. Увеличен тот же самый диск, что и на предыдущем снимке (Д); после инкубации в течение еще 2 нед.

2.2.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычные материалы для работы с культурой ткани (приложение 2[1]).
- Эксплантаты, приготовленные, как описано в приложении 2[IV].
- А. Стерильные проростки (например, лен, горох, *Brassica napus* и свекла).

- Б. Стерильные культуры побегов (например, *N. tabacum*, *Petunia* и картофель), полученные путем размножения пазушных почек.
- В. Срезы запасяющих органов моркови (главного корня), свеклы (разбухшего гипокотыля) и картофеля (модифицированных столонов — корневых побегов).
- Ночные культуры агробактерий (разд. 1.3):
- А. Неонкогенный штамм *A. tumefaciens* (например, C58C1 (pGV3850) [84]).
- Б. Онкогенный штамм *A. tumefaciens*, содержащий доминантный селективный маркерный ген (например, pTiB6S3::pMON 200 содержит pos-*npt-II*-ген, способный, как известно, к эффективной экспрессии в растительных клетках [30]).
- В. Штамм *A. rhizogenes* дикого типа (например, A4 [77]).
- Г. Штамм *A. rhizogenes* дикого типа, несущий неонкогенный бинарный вектор (например, A4(pBin19) [35]).

Растворы

[Ростовые среды (приложение 2[II]) и антибиотики [приложение 2[III]].]

- Чашки Петри диаметром 9 см, содержащие 25 мл агаризованной среды для поддержания жизнеспособности эксплантатов во время совместного культивирования с агробактериями (например, MSO и RD) и для удаления бактерий после трансформации (например, MSO+Cx [250 мкг/мл] и RD+Cx [250 мкг/мл]).
- 100 мл жидкой ростовой среды для разведений инокулята *Agrobacterium* (например, среды MSO).

2.2.3. Методика

Индукция опухоли на больших эксплантатах, когда участки поражения удалены от ростовой среды

Данные методы подразумевают использование стерильных проростков, целых органов растения или срезов запасяющих тканей, культивируемых на средах, не содержащих бактериостатических агентов.

1. Готовят стерильные эксплантаты, как описано в приложении 2[IV].
2. Стерильным скальпелем срезают верхушки у размножаемых *in vitro* растений^{a)} или у развивающихся стерильных проростков либо используют недавно начавший формироваться стебель, целый лист, целый черешок или эксплантаты запасяющих органов.

3. Инокулируют поверхности разреза с помощью микробиологической петли ночной культурой⁶⁾ агробактерий, как изображено на рис. 2.6. Кроме того, можно повредить ткань растения иглой для подкожных инъекций (номер 25) или зубочисткой, которые предварительно погрузили в ночную культуру агробактерий⁷⁾.
4. Инкубируют инокулированный растительный материал в течение 2—6 нед при 25 °С и низкой освещенности (2000—4000 люкс) и периодически наблюдают за ростом корончатого галла⁷⁾ или косматого корня.

Индукция опухоли на небольших эксплантатах в условиях контакта участков поранения с питательной средой

Для воспроизведения данного метода используют эксплантаты (гипокотили, семядоли) стерильных развивающихся проростков (приложение 2[IVA]), фрагменты проростков более позднего возраста (стебель, черешок, корни и листья) и срезанные ткани (например, листья, черешки и чашелистики) от более зрелых тепличных растений (приложение 2[IVB]). Срезы тканей инкубируют в жидкой питательной среде, содержащей небольшое количество агробактерий в течение такого промежутка времени, чтобы успела пройти трансформация, а затем переносят на твердую среду, содержащую бактериостатические агенты для инактивации агробактерий.

1. Готовят фрагменты ткани из стерильных проростков или более зрелых растений (приложение 2[IV]).
2. Готовят 20 мл разведенной в 50 раз ночной культуры агробактерий в жидкой ростовой среде (например, в MSO) и выливают в чашку Петри диаметром 9 см.
3. Помещают 15—100 срезанных кусочков ткани (в зависимости от размера) в суспензию агробактерий и инкубируют в течение 2—5 ч²⁾ в стерильном ламинарном боксе.
4. Переносят эксплантаты на твердую питательную среду, например MSO (30—100 эксплантатов на чашку), и инкубируют (25 °С) при низкой освещенности (2000—4000 люкс) в течение 2—6 дней либо до тех пор, пока не начнут появляться бактериальные колонии.
5. Переносят эксплантаты на твердую питательную среду, содержащую бактериостатические антибиотики (например, MSO+Сх [250 мкг/мл])^{е), ж)}, и инкубируют, как указано на стадии 4, в течение 3—6 нед, постоянно наблюдая за их состоянием.

Оценка индукции опухоли

В некоторых случаях опухоли, индуцированные при различных комбинациях эксплантата и штамма агробактерии, можно

различить уже через одну неделю и наблюдать за их развитием с помощью обычной лупы. Важно оценить, какие слои клеток в эксплантатах каждого типа чувствительны к трансформации, и сделать тщательные наблюдения, которые помогут в будущем выработать оптимальную стратегию трансформации⁷. Таким образом, в отношении всех типов эксплантатов изучаемых растений следует поставить следующие вопросы.

1. Каков результат трансформации различных эксплантатов неонкогенным штаммом *A. tumefaciens*, например C58C1 (pGV3850)? В частности, какие слои тканей/клеток в эксплантате еще способны к ограниченному клеточному делению и образованию каллуса после инфицирования агробактериями на данной среде?
2. Действительно ли эксплантаты различных органов одних и тех же видов отвечают на индукцию опухоли онкогенными штаммами агробактерий различным образом? Каково, например, влияние эксплантата на частоту индукции опухолей, на время, которое проходит до появления неопластического роста, на локализацию, размер опухоли и морфологию?
3. Существует ли зависимость между зонами нормального образования каллуса и локализацией опухолей, индуцируемых на различных эксплантатах?

В качестве примера на рис. 2.7 приведены типичные результаты инокуляции ряда эксплантатов запасющих органов различными штаммами агробактерий. На эксплантате моркови, инокулированном неонкогенным штаммом C58C1 (pGV3850), можно ясно видеть, что в ограниченной области происходит образование каллуса (рис. 2.7, А). Элементарные знания анатомии главного корня моркови позволяют предположить, что клетки, отвечающие на поранение дедифференциацией и делением, локализуются в сосудистых тканях или вблизи от них. Частота образования каллуса будет различной у разных видов. Наблюдения на эксплантате моркови, инокулированном онкогенным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* (рис. 2.7, Б), показывают, что образование опухолей происходит в тех же участках, что и нормальное каллусообразование. На срезах свеклы после инокуляции *A. tumefaciens* узкие зоны опухолевого роста тоже формируются вблизи сосудистых тканей (рис. 2.7, В). Пожалуй, наиболее очевидные данные о месторасположении компетентных клеток могут быть получены при выявлении локализации участков усиленного роста косматых корней, индуцированных штаммов *A. rhizogenes* A4 (рис. 2.7, Г). Каждый корешок образовался в результате отдельного события трансформации и может быть легко идентифицирован, поскольку имеет тенденцию «вырастать» из эксплантата, и поэтому корешки нельзя спутать с индуцированным поранением каллусом. Таким

образом, на клубнях картофеля, который состоит в основном из запасающей ткани паренхимы, в ответ на раневое поражение области деления клеток распределяются случайным образом так же, как и косматые корни (рис. 2.7, Г). В то же время на моркови косматые корни образуются главным образом из сосудистых тканей (рис. 2.7, Д, Е).

Культивирование опухолей и селекция трансформированных клеток

Располагая изложенными выше сведениями, можно воспроизвести эксперименты, используя онкогенные штаммы агробактерий, содержащие векторы с доминантными селективными маркерными генами, и подбирая соответствующие условия (например, концентрацию антибиотиков и временной режим инокуляции до применения селекции). Это обеспечит селекцию резистентных к антибиотику трансформированных клеток на средах, не содержащих добавок фитогормонов^{д)}.

Впоследствии в случае успеха аналогичные процедуры можно использовать для трансформации растительных клеток неонкогенными векторами, несущими доминантные маркерные гены, и для получения резистентных к антибиотику каллусов или побегов на средах, содержащих соответствующие концентрации фитогормонов и селективного агента.

В другом случае может оказаться более целесообразным перенести бинарные векторы с помощью конъюгации в штамм агробактерий, проявляющий повышенную вирулентность в отношении интересующих исследователя эксплантатов, а затем попытаться регенерировать резистентные к антибиотику побеги из трансформированных, неонкогенных клеток, присутствующих в опухолевой ткани.

1. Удаляют опухоли из больших эксплантатов диаметром 3—10 мм или косматые корни при длине 0,5—1,5 см и помещают на 5 мл соответствующей агаризованной среды, содержащей бактериостатический агент [например, MS+Сх (500 мкг/мл)]^{е), ж), з)}, в пластиковую чашку Петри диаметром 5 см. Кроме того, срезают опухоли, растущие из участков поранения на небольших эксплантатах, или переносят эксплантаты целиком на ту же самую среду, содержащую антибиотик^{е), ж)}. На этой стадии на каждую чашку удобно поместить по 5—15 опухолевых новообразований, чтобы обеспечить достаточную плотность инокулируемых тканей и быстрый рост трансформированных тканей.
2. Через 3—6 нед (в зависимости от скорости роста опухолевой ткани) переносят эксплантаты на MSO, содержащую 250 мкг/мл цефотаксима^{д), е)}, и с этого момента сохраняют на этой же среде до тех пор, пока ткани не «освободятся»

от агробактерий. В противном случае, если цефотаксим не подходит^{е)}, используют пониженные концентрации других бактериостатических антибиотиков. Приготовление стерильных исходных растворов антибиотиков описано в приложении 2[III]. Заметим, что опухоли могут быть перенесены на среду, содержащую антибиотики, с целью селекции трансформированных растительных клеток, в которых экспрессируются доминантные маркерные гены на любой стадии (например, при трансформации с использованием рTiB6S3::pMON200)^{е), ж), з)}.

3. Можно регенерировать трансформированные растения из косматых корней, индуцированных у определенных видов (приложение 2[VIII]). Из некоторых корончатых галлов дикого типа, индуцированных у определенных видов (тополь и люцерна), тоже удалось регенерировать трансформированные растения с нормальной морфологией и фертильностью. Таким образом, если в качестве помощника *vir*-функций бактериального хозяина используют штаммы *A. rhizogenes* или *A. tumefaciens*, содержащие Ri- или Ti-плазмиды дикого типа, то можно разработать среды^{д), е), ж)} и условия культивирования, позволяющие регенерировать из опухолей резистентные к антибиотику трансформированные побеги. Часть последних может утратить онкогенную Т-ДНК и представлять собой морфологически и физиологически нормальные побеги (сведения относительно отдельных видов даиы в приложении 2[VIII]).
4. Периодически проверяют стерильность корончатых галлов или косматого корня путем инкубации небольших кусочков в питательном бульоне в течение 2 сут при 25°C с интенсивной аэрацией на качалке. Если опухоль не содержит бактерий, то она может расти на среде, свободной от бактериостатических антибиотиков. Однако всегда благоразумно сохранять образцы наиболее важных линий трансформированных клеток, используя среды, содержащие бактериостатические антибиотики.

Разработка конкретной методики трансформации с помощью неонкогенных векторов

Исходя из описанных выше предварительных опытов с онкогенными штаммами агробактерий, разработка методики успешной трансформации, как правило, основывается на следующих экспериментах:

1. Идентифицируют эксплантаты, которые дают начало дедифференцированным клеткам, способным к регенерации побочных побегов или эмбриогенезу. Для этого необходимо рассмотреть следующий круг вопросов: Каков регенеративный

потенциал слоев клеток, компетентных для трансформации? Образуют ли способные к трансформации ткани каллус, который после срезания и субкультивирования на среде для регенерации перейдет к органогенезу побегов или эмбриогенезу? Может быть, можно прямо регенерировать побеги после ограниченного образования каллуса, пока он еще прикреплен к исходному эксплантату? И наконец, будет ли эксплантат нормально продуцировать побеги без промежуточной стадии каллуса непосредственно от зачатков, индуцированных в более глубоких слоях эксплантата?

2. Для разработки методов получения неопластических, резистентных к какому-либо антибиотику каллусов на безгормональной среде в качестве помощников используют онкогенные *vir*-плазмиды с бинарными векторами, содержащими доминантный ген устойчивости к антибиотику^{а)}. Это позволяет определить условия, оптимальные для трансформации.
3. Подбирают условия селекции, позволяющие отбирать резистентные к антибиотику каллусы или регенерированные растения из эксплантатов, трансформированных неонкогенными векторами на содержащей гормоны среде.

Примечания

- ^{а)} В качестве примера получение размноженных побегов табака описано в разд. 2.4.3.
- ^{б)} При выращивании бактериального инокулята (см. разд. 1.3) в некоторых случаях целесообразно перед инокуляцией осадить бактерии и ресуспендировать их в ростовой среде для растений.
- ^{в)} При использовании агробактерий, вызывающих образование побеговых мутантов, как правило, лучше инокулировать эксплантаты, содержащие неповрежденный апекс, который будет продуцировать ауксины и способствовать опухолевому росту.
- ^{г)} Не путайте каллусообразование (часто ассоциированное с сосудистыми тканями) с неопластическим ростом. Тщательные наблюдения помогут определить области компетентных клеток в эксплантате для будущей работы с неонкогенными векторами.
- ^{д)} На этой стадии агробактерии прикрепляются к клеткам, расположенным в участках поранения. Предложены различные методики, при воспроизведении которых эксплантаты оставляют в жидкой среде на продолжительное время, чтобы произошли и прикрепление, и трансформация. Время инкубации в этом случае может составлять до нескольких дней в зависимости от того, как инкубация влияет на жизнеспособность эксплантата. Однако многие ткани быстро разрушаются при инкубации в жидкой среде, особенно в присутствии высоких концентраций агробактерий. Таким образом, большинство типов эксплантатов достаточно обмачнуть в среду, содержащую агробактерии, и трансформация происходит в норме на твердой среде в течение двух дней перед переносом на среду, содержащую бактериостатические антибиотики. Среда MSO может не подойти для поддержания эксплантатов в процессе трансформации некоторых видов растений. Возможно, для сохранения жизнеспособности, стимулирования клеточного деления и достижения компетентности к трансформации потребуется добавить в нее ростовые

фитогормоны, особенно цитокинины. В частности, при использовании онкогенных плазмид в качестве *vir*-помощников для неонкогенных бинарных векторов важно стимулировать деление трансформированных, резистентных к антибиотикам неонкогенных клеток в месте поранения на соответствующей среде, содержащей фитогормоны.

- е) При работе с некоторыми эксплантатами среда MSO+Cx (приложение 2[11]) не подавляет рост агробактерий или ингибирует образование каллуса. В этом случае можно использовать другие антибиотики, которые ингибируют бактериальный рост и не оказывают заметного влияния на жизнеспособность многих эксплантатов, например: рифампицин (50 мкг/мл) в сочетании с тетрациклином (10 мкг/мл), карбенициллин (500 мкг/мл), ванкомицин (100 мкг/мл).
- ж) MSO может не подойти для роста культур корончатых галлов или косматого корня некоторых видов, и соответственно могут потребоваться другие среды, содержащие низкие концентрации гормонов или более сложные добавки. Особенно важно использовать такие среды на ранних стадиях после индукции опухоли, если экспериментатор пытается регенерировать побеги из неонкогенных клеток, содержащихся в ткани, поскольку обычно их рост не стимулируется средами, свободными от экзогенных фитогормонов.
- з) На эксплантатах многих видов косматые корни или корончатые галлы могут установиться гораздо быстрее, если их перенести на среды, содержащие бактериостатические антибиотики, пока они еще прикреплены к кусочкам первоначального эксплантата стебля, черешка или листа.

2.3. Трансформация больших гетерогенных эксплантатов с помощью неонкогенных T₁-плазмидных векторов

Приступить к эксперименту по трансформации с помощью неонкогенных векторных систем следует после выбора подходящих эксплантатов и условий инокуляции и селекции, позволяющих получать резистентные к антибиотикам каллусы с помощью онкогенных штаммов агробактерий и *vir*-помощников (описанных в разд. 2.2). Необязательно, что условия, дающие эффективную трансформацию определенного эксплантата с помощью онкогенной векторной системы, подойдут для трансформации с помощью неонкогенных векторов. Неонкогенные ткани гораздо чувствительнее к условиям культивирования, поскольку в них, очевидно, не проявляются физиологические и ростовые свойства ткани корончатых галлов и косматого корня. И в этом случае подходящие комбинации *vir*-систем, хозяйских штаммов агробактерий и селективных генов можно установить только эмпирически.

Большие гетерогенные эксплантаты — это срезы органов, содержащие огромное количество клеток. Например, такие эксплантаты, как листовые диски или сегменты стебля, клубня, корня, черешка и проростка, часто содержат различные типы

тканей и клеток, способных при культивировании *in vitro* дедифференцироваться и переходить к пролиферации. После обработки подобных эксплантатов агробактериями для регенерации трансформированных растений можно использовать три основных способа.

1. Трансформированные побеги можно регенерировать непосредственно из каллуса, развивающегося на эксплантатах в селективных условиях, используя среду для индукции побегов, содержащую антибиотики.
2. Побеги можно регенерировать непосредственно из эксплантатов на среде для регенерации и провести скрининг на экспрессию маркеров трансформации. Кроме того, трансформированные побеги можно определить по нормальной способности к корнеобразованию на селективной среде.
3. Трансформированные побеги можно регенерировать через стадию каллуса. В этом случае с помощью культивирования на соответствующей селективной среде на эксплантатах получают каллусы. Затем из установившихся трансформированных тканей (калусных или суспензионных культур) индуцируют индивидуальные побеги путем эмбрио- или органогенеза на среде для регенерации. Стратегия включает, во-первых, регенерацию в присутствии селектирующего агента и, во-вторых, без селектирующего агента с последующим укоренением в его присутствии или скринингом на экспрессию маркерного гена.

Итак, побеги можно регенерировать либо непосредственно из эксплантатов, либо через стадию каллуса, а селекцию проводить или одновременно с регенерацией, или после нее.

При использовании агробактерий в качестве трансформирующих векторов существенно, чтобы достаточное число интактных клеток в участках поранения тканей эксплантатов переходила к дедифференцировке и клеточному делению. Следует сохранить на минимальном уровне прямой органогенез адвентивных органов и продолжающийся рост из предсуществующих меристем, поскольку нет уверенности, что клетки, вступившие на этот путь развития, могут быть трансформированы. Если не контролировать последние два пути развития, то придется применять лабораторные методы скрининга для идентификации трансформированных побегов на фоне гораздо большей популяции побегов, полученных из нетрансформированных тканей.

В качестве примера ниже описывается получение подходящих эксплантатов из тепличных растений табака (листовых дисков) и из культивируемых *in vitro* проростков льна (гипокотилей). Подробности, касающиеся других видов растений, см. в приложении 2[VIII].

Разработка системы неонкогенной трансформации для больших гетерогенных эксплантатов сводится к следующим этапам:

1. Определяют подходящую среду, которая стимулирует регенерацию побегов из участков поранения (желательно у ряда эксплантатов).
Примечание: Важно убедиться, что зачатки побегов не развиваются из клеток, находящихся в глубоких слоях первоначального эксплантата, поскольку они не чувствительны к агробактериям!
2. Определяют наиболее благоприятные внешние условия для роста растения-донора, чтобы получить наиболее чувствительные эксплантаты.
3. Оценивают оптимальный тип и размер эксплантата, который можно использовать при данном объеме среды и в данной культуральной посуде.
4. Определяют концентрации соответствующего антибактериального агента (например, цефотаксима или карбенициллина), которые ингибируют рост агробактерий, но еще допускают более или менее нормальное образование каллуса и регенерацию побегов.
5. Определяют минимальные концентрации селективирующих агентов (антибиотиков, например канамицина, гигромицина и блеомицина, или гербицидов, например глифосата), которые подавляют: а) образование каллуса; б) регенерацию побегов и в) укоренение побегов.
6. Подбирают условия инокуляции и инкубации, которые позволяют эксплантату достаточное время оставаться жизнеспособным при контакте с агробактериями, чтобы обеспечить возможность трансформации без нарушения образования каллуса или регенерации побегов.
7. Подбирают оптимальную комбинацию *vir*-помощника, Ti-плазмиды и собственного генотипа агробактерий.

Результаты этих экспериментов позволяют разработать новые системы трансформации с использованием любых типов больших гетерогенных эксплантатов и не ограничиваются только листовыми дисками или срезами гипокоты.

2.4. Прямая регенерация трансформированных растений: трансформация листовых дисков табака

2.4.1. Основные положения

Во многих случаях при культивировании растительной ткани легче регенерировать побеги из эксплантатов органов, чем из полученных на основе протопластов тканей или устоявшихся

(адаптированных) каллусных культур. Онкогенная область Т-ДНК во многих широко используемых неонкогенных векторах *A. tumefaciens* заменена на доминантный селективный маркерный ген. В настоящем эксперименте маркерный ген кодирует фермент неомизинфосфотрансферазу-II (NPT-II), однако можно использовать и другие маркерные гены, и эксплантаты различных видов растений (приложение 2[VIII]). Неомизинфосфотрансфераза-II фосфорилирует и, таким образом, инактивирует антибиотик канамицин, который в норме токсичен для клеток высших растений. Трансформированные клетки в месте поранения, экспрессирующие ген NPT-II, можно отбирать на средах, содержащих канамицин. В другом случае инокулированные эксплантаты можно поместить на среду для регенерации побегов, где Km^r-побеги развиваются непосредственно из трансформированных клеток с небольшим дополнительным образованием каллуса. Агробактерии удаляют путем обработки антибиотиками, которые нетоксичны для растительных клеток, такими, как цефотаксим (более подробную информацию об антибиотиках см. в приложении 2[III]).

Листовые диски, полученные от размножаемых *in vitro* или тепличных растений, особенно удобны для экспериментов по трансформации пасленовых, например *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida* и томатов (см. [40, 49]), а также некоторых других семейств. При культивировании на соответствующих средах листовые диски быстро переходят к формированию каллуса в области срезанных краев эксплантата, особенно там, где они находятся в контакте со средой. Если такие эксплантаты поместить непосредственно на среду для регенерации побегов, то в течение короткого промежутка времени (10—15 дней) вблизи срезанных краев появляются побеги вместе с сопутствующим каллусом. Среда, которые стимулируют регенерацию из листовых дисков, обычно отличаются высоким отношением цитокининов к ауксинам.

Описанная в настоящем разделе методика трансформации предусматривает использование листовых дисков *Nicotiana tabacum*. Важно отметить, что срезы листовых пластинок табака не содержат покоящихся почек или преформированных зачатков органов и, следовательно, большинство побегов, формирующихся у края среза, происходит из дедифференцированных клеток, чувствительных к трансформации агробактериями. Многие другие типы эксплантатов содержат покоящиеся меристемы или почки и могут преимущественно продуцировать зачатки побегов из меристем камбия или других глубоких слоев клеток эксплантата, которые нечувствительны к агробактериям. Такая ситуация с гипокотылями льна, и для подобных эксплантатов требуется другой подход к регенерации трансформирован-

ных побегов (разд. 2.5). Обсуждение методов регенерации растений можно найти в ряде обзоров [3, 24, 28]. Следует подчеркнуть, что метод листовых дисков применим не ко всем видам, поскольку его воспроизведение целиком зависит от способности эффективно регенерировать побеги из дедифференцированных клеток в месте поранения. Например, доказано, что довольно трудно адаптировать данный метод для картофеля (хотя он и относится к пасленовым [67]).

2.4.2. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

- Обычные материалы для культуры тканей (приложение 2[I]).
- Горшки (H. Smith Plastics Ltd.), содержащие компост Ле-вингтона (Fisons Ltd.).
- Маленькие прозрачные пластиковые пакеты.
- Ночные культуры неонкогенных штаммов агробактерий, несущих доминантные маркерные гены, и контрольных штаммов (приложение 1[II]), разведенные в 50 раз жидкой средой для культивирования растений (например, MSO). Для примера:

C58C1 (pGV3850) — Ti-плазмида нопаинового типа с делетированными *опс*-генами.

C58C1 (pGV3850 : : 1103) — pGV3850 со встроенным в T-ДНК *pos-npt-II* геном.

Или:

LBA4404 — штамм *vir*-помощник, несущий Ti-плазмиду, у которой T-ДНК и последовательности прямого повтора длиной 25 п. н. делетированы (pAL4404).

LBA4404 (pBin19) — штамм с бинарным вектором, содержащим селективный маркерный ген *pos-npt-II*, неонкогенной плазмидой и *vir*-помощником.

- Листья табака (только что полностью распутившиеся) от тепличных растений 3-месячного возраста или размножаемых *in vitro*.

Растворы

[Ростовые среды для растений (приложение 2[II]) и антибиотики (приложение 2[III]).]

- Среда для прямой регенерации побегов из листовых дисков (например, MSD4×2 для табака) и та же среда, содержащая бактериостатические антибиотики и/или агент для селекции трансформантов (агаризованная, по 25 мл в чашках Петри диаметром 9 см и по 6 мл в чашках диаметром 5 см).

Например, для трансформации листовых дисков табака и селекции К_т-побегов:

	Количество чашек
MSD4×2	20
MSD4×2+Сх (250 мкг/мл)	10
MSD4×2+Сх (250 мкг/мл)+К _т (100 мкг/мл)	10
MSD4×2+К _т (100 мкг/мл)	2

- Среда для укоренения с бактериостатическими антибиотиками (например, MSO+Сх для табака), содержащая и не содержащая агент для селекции трансформантов [по 60 мл в сосудах для культивирования Plantcon (Flow Laboratories Ltd.), по 40 мл в банках на 200 мл Powder Round Jars (Beatson, Clark & Co. Ltd.) или по 25 мл в чашках Петри диаметром 9 см в зависимости от размера побегов]. Например, для селекции К_т-побегов табака:

MSO+Сх (250 мкг/мл)
MSO+Сх (250 мкг/мл)+К_т (100 мкг/мл)

- Среда для размножения трансформированных побегов [например, для табака MSK по 60 мл в сосудах Plantcon (Flow Laboratories Ltd.) или по 40 мл в банках на 200 мл (Beatson, Clark & Co. Ltd.)].

2.4.3. Методика

Трансформация

1. Помещают молодые (только что полностью распустившиеся) листья табака в плоский стерильный сосуд из пирекса и заливают 10%-ным раствором моющего средства Domestos. Осторожно, чтобы не повредить листья, удаляют все пузырьки с поверхности листьев путем осторожного помешивания стерильным шпателем и оставляют на 15 мин^а).
2. Тщательно ополаскивают 4 раза в 400 мл стерильной водопроводной воды.
3. Работая на стерильной белой кафельной плитке, удаляют все белые, поврежденные при стерилизации участки листьев и среднюю жилку, а затем разрезают лист на квадраты площадью 0,5—1 см² с помощью нового стерильного скальпеля. Режущий инструмент следует регулярно стерилизовать, погружая в спирт и обжигая в пламени горелки. Перед тем как разрезать эксплантат, инструменты необходимо охладить. Подготавливают достаточное количество материала, чтобы получить 200 кусочков листа, однако во избежание высыхания не следует нарезать сразу весь материал. Достаточно за один раз нарезать кусочки листа на 2—3 чашки. Помещают по 10—12 кусочков листа на каждую из 20 чашек

со средой MSD4×2⁶⁾ и герметизируют чашки липкой лентой Nescofilm. Инкубируют чашки в течение 2 сут при 24—26 °C и низкой освещенностью (2000 люкс, фотопериод 16 ч).

4. Эксперимент включает следующие контроли:

Контроли (8 чашек). Помещают по два инокулированных контроля на каждую из нижеперечисленных сред:

MSD4×2

MSD4×2+Сх

MSD4×2+Сх+Км

MSD4×2+Км

Инокуляции (12 чашек). Подготавливают по 6 чашек для каждого штамма агробактерий. Помещают кусочки листа в разведенную 1:50 суспензию соответствующего штамма агробактерий, стряхивают избыток жидкости^{в)} и помещают их на исходную чашку^{г), д)} с MSD4×2. Обматывают края чашки липкой лентой Nescofilm и инкубируют (24—26 °C) при слабой освещенности (2000—4000 люкс) еще 2—4 дня^{д), е)}. Регулярно проверяют чашки на бактериальную контаминацию.

5. После^{е)} инкубации с агробактериями в течение 2 сут или при появлении видимых бактериальных колоний переносят инокулированные кусочки листа на следующие среды^{б), д)} (одна для каждого штамма):

3 чашки MSD4×2+Сх+Км

3 чашки MSD4×2+Сх

6. Инкубируют чашки при низкой освещенности^{ж)} (2000—4000 люкс) (24—26 °C), периодически наблюдая за развитием побегов и каллуса^{ж)}.

7. На рис. 2.8 представлены результаты типичного эксперимента по трансформации листовых дисков табака. Следующий этап процедуры трансформации — срезание побегов, развившихся в различных условиях обработки, и перенесение их на селективную среду для укоренения и выявления трансформированных побегов. Если эксперимент по трансформации данного сорта проводится впервые, то прежде, чем переносить побеги, важно сделать некоторые наблюдения, помогающие спланировать дальнейшие эксперименты с помощью метода листовых дисков.

Итак, определяют участки образования каллуса и регенерации побегов (используют препаровальную лупу). Определяют число и размер побегов, получаемых при каждой обработке, и оценивают:

1. Нормальную способность листовых дисков формировать каллус и регенерировать побеги (рис. 2.8, А).

2. Влияние бактериостатического агента (в данном случае, цефотаксима) на образование каллуса и регенерацию побегов.

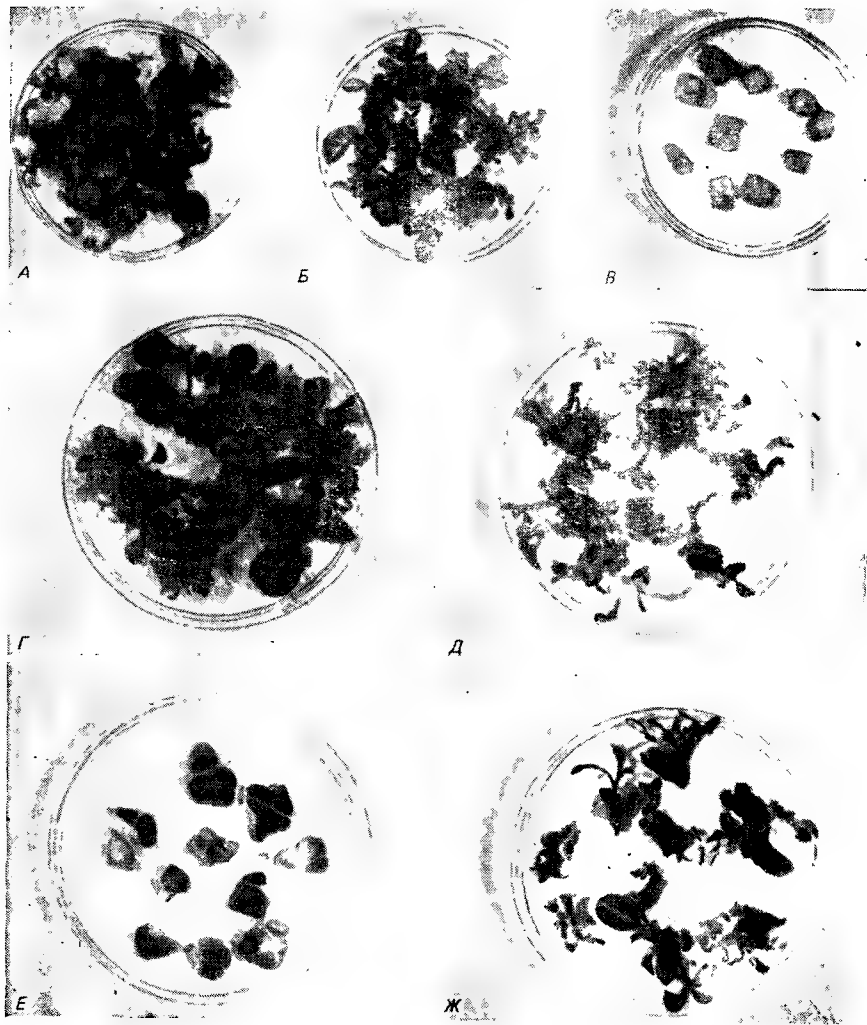


Рис. 2.8. Трансформация листовых дисков табака. Внешний вид листовых дисков через 5—6 нед инкубации на различных средах. А. Неинкулированные диски на среде для регенерации побегов, MSD4×2. Б. Неинкулированные диски на MSD4×2+200 Сх. В. Диски на MSD4×2+100 Км. Г. Диски, инокулированные штаммом *A. tumefaciens* C58C1 (pGV3850) и помещенные на чашку с MSD4×2+200 Сх. Д. Диски, инокулированные штаммом *A. tumefaciens* C58C1 (pGV3850::1103) и помещенные на чашку с MSD4×2+200 Сх. Е. Диски, инокулированные штаммом *A. tumefaciens* C58C1 (pGV3850), на чашке со средой MSD4×2+200 Сх+100 Км. Ж. Диски, инокулированные штаммом *A. tumefaciens* C58C1 (pGV3850::1103), на среде MSD4×2+200 Сх+100 Км.

- Так, сравнивают регенерацию на средах MSD4×2 (рис. 2.8, А) и MSD4×2+Сх (рис. 2.8, Б).
3. Влияние агробактерий на образование каллуса и регенерацию побегов. Так, сравнивают ответ инокулированных (рис. 2.8, Г, Д) и неинокулированных листовых дисков (рис. 2.8, Б) на MSD4×2+Сх.
 4. Действие агента для селекции трансформантов (в данном случае канамицина) на образование каллуса и регенерацию побегов. Сравнивают ответ неинокулированных контролей на MSD4×2 (рис. 2.8, А) и MSD4×2+Км (рис. 2.8, Б).
 5. Влияние переноса гена Км^r на образование каллуса и побегов в присутствии канамицина. Так, сравнивают листовые диски на MSD4×2+Сх+Км, инокулированные C58C1 (pGV3850) (рис. 2.8, Е), с листовыми дисками на той же среде, инокулированными C58C1(pGV3850 : : 1103) (рис. 2.8, Ж).

Примечания

- а) 10%-ный Domestos содержит около 1% активного хлора и эквивалентен 1%-ному раствору гипохлорита кальция или натрия. Domestos содержит смачивающий агент, который способствует процессу стерилизации. Концентрацию стерилизующего вещества и время инкубации следует подбирать заранее, чтобы достигнуть эффективной стерилизации, не вызывая значительных повреждений ткани.
- б) MSD4×2 предназначена для стимулирования регенерации побегов из эксплантатов листа.
- в) Длительное смачивание некоторых типов листьев может оказать нежелательное влияние на результат эксперимента, и его следует избегать. У таких видов, как картофель, целесообразно вызвать образование каллуса на краях среза эксплантата за несколько дней до обработки агробактериями.
- г) В некоторых случаях полезнее инкубировать инокулируемые кусочки листа на «подпитывающем» (фидерном) слое (разд. 2.10.2.2), не содержащем антибиотиков, чтобы стимулировать деление растительных клеток вблизи среза краев и способствовать трансформации [40].
- ж) Для эксплантатов других видов растений может оказаться полезной стимуляция образования каллуса (с селекцией или без селекции на Км) у края среза ткани путем подрашивания в течение нескольких дней на среде для каллусообразования (например, MSPI для табака, приложение 2 [II]), до переноса на среду для регенерации побегов.
- е) Время инкубации должно быть достаточно продолжительным, чтобы позволить агробактериям трансформировать растительные клетки, но нельзя допускать, чтобы кусочки листа зарастали бактериями и происходила гибель клеток.
- ж) Кусочки листа часто разбухают, закручиваются, и в результате края среза теряют контакт со средой. Поэтому рекомендуется надрезать эксплантат и прижать края среза листовых дисков к питательной среде.

Укоренение трансформированных побегов

Как правило, дифференцированные структуры, например побеги, менее чувствительны к селективным агентам (например, канамицину), чем каллус. Таким образом, в зависимости от

концентрации антибиотика нетрансформированные побеги иногда выживают в процессе селекции [40, 49]; это явление часто рассматривают как «пробой» («escapes»). Однако корни, как правило, в большей степени чувствительны к антибиотикам, и, следовательно, способность побегов укореняться на селективной среде, содержащей более высокие концентрации селективного агента (например, канамицина), представляет собой весомое доказательство их трансформированной природы^{a)}.

1. Берут регенерирующие кусочки листа, полученные при инокуляциях C58C1(pGV3850::1103) или LBA4404(pBin19), со среды MSD4×2+Cx+Km и помещают в чашку Петри.
2. Срезают достаточно большие побеги, чтобы с ними было легко манипулировать (>0,5 см), и полностью удаляют каллус.
3. Подрезают нижнюю часть побега, пока не останется верхушечная почка и два или три листа с пазушными почками. Не пытайтесь укоренять веретенообразные (длинные и тонкие) или слишком сильно этиолированные побеги, поскольку в дальнейшем они трудно приживаются в почве. Избегайте подсыхания побегов и сразу же переносите их на среду для ускорения.
4. Помещают срезанные побеги основанием вниз в агар со средами MSO+Cx^{b), в)} (приложение 2[11]) и MSO+Cx+Km и инкубируют при 24—28 °C и средней освещенности (4000 люкс). Контрольный опыт на среде, не содержащей селективного агента, необходим, чтобы удостовериться в том, что укоренение происходит нормально.
5. Повторяют стадии 1—4 с побегами, регенерированными из кусочков листа на среде MSD4×2+Cx, которые были инокулированы неонкогенными векторами без селективных маркерных генов [например, LBA4404 или C58C1(pGV3850)], чтобы убедиться в надежности процедуры селекции.
6. В последующие 5—20 дней периодически наблюдают за эксплантатами побегов, следя за появлением признаков образования корней, хлороза и формирования новых листьев. Некоторые нетрансформированные побеги часто успевают пускать новые побеги прежде, чем становятся хлоротическими, а впоследствии погибают только через несколько недель культивирования на среде, содержащей селективный агент (например, канамицин). Однако в большинстве случаев только трансформированные побеги успешно укореняются на среде, содержащей канамицин. Следует еще раз отметить, что часть побегов, полученных из листовых дисков, нередко укореняется в присутствии селективного агента; такие «неудачи» в порядке вещей.

Примечания

- ^{a)} Для многих видов более эффективной может оказаться регенерация побегов на неселективных средах, а селективное давление следует применять на стадии укоренения.
- ^{b)} Чтобы свести к минимуму образование каллуса, среды, используемые для укоренения регенерированных побегов, обычно не содержат фито-гормонов либо содержат небольшое количество «слабого» ауксина, например ИУК. Обычно в этих условиях укоренение возможно, поскольку верхушка побега продуцирует ИУК, который транспортируется вниз по стеблю и индуцирует рост корней у основания. В некоторых случаях желательно дать побегу прижиться на среде для укоренения без канамидина, позволяя ему образовать несколько новых листьев, прежде чем снова отрезать корни и попытаться укоренить на среде, содержащей канамидин.
- ^{в)} Бактериостатические антибиотики часто вводят в среду, если какие-либо агробактерии выжили при предшествующей обработке. Однако это дорого; кроме того, антибиотики иногда тормозят рост побегов и формирование корней.

Поддержание и размножение трансформированных побегов

Для размножения культивируемых побегов многих видов растений известны два основных способа. Побеги можно высадить в компост, выращивать их фотоавтотрофно и размножать путем получения семян. Это, разумеется, необходимо для изучения нормальной экспрессии и наследования перенесенного гена. Однако может оказаться, что после длительной тяжелой работы регенерировано всего несколько трансформированных побегов. В этих случаях целесообразнее размножить этот чрезвычайно ценный материал вегетативно. Такая необходимость возникает потому, что многие гетеротрофные побеги не приживаются в почве как фотоавтотрофные растения (культивируемые побеги не способны к интенсивному фотосинтезу, а зависят от питательных веществ, содержащихся в ростовой среде). До тех пор пока растения не «закалятся» (сформируют восковую кутикулу), многие из них будут увядать и никогда не восстановятся. Кроме того, в этих условиях растения очень восприимчивы к поражению грибами. Возможна и атака вредителей или патогенов прежде, чем завяжутся семена, так что разумно сохранять линии растений в культуре. Для примера в следующем разделе описано размножение побегов табака.

Размножение табака с помощью пазушных почек^{a)}

1. Удаляют укорененные побеги со среды и помещают на стерильную белую кафельную плитку.
2. Разрезают стебель на несколько частей, каждая из которых содержит пазушную почку, как изображено на рис. 2.9. Удаляют листья, оставив только короткие (2—3 мм) отрезки черешков.

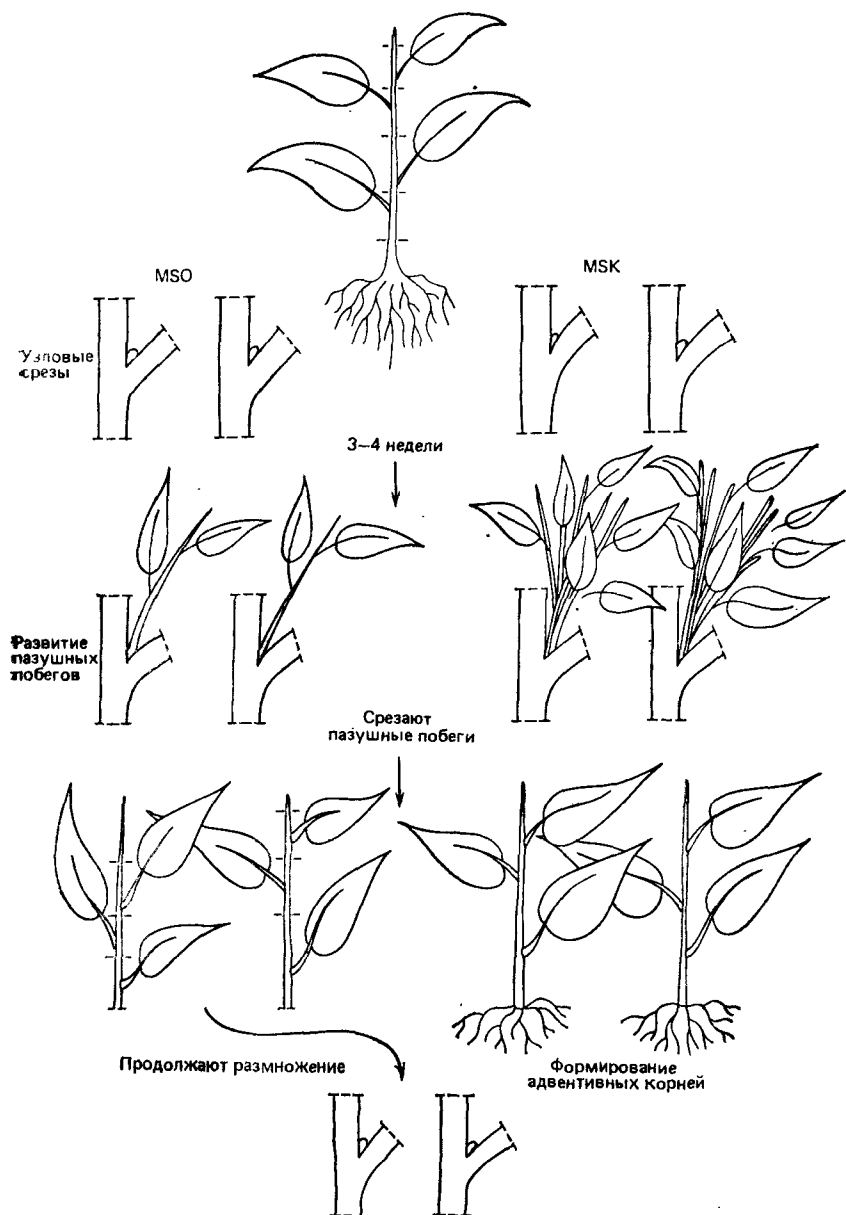


Рис. 2.9. Размножение растений в стерильных условиях путем развития пазушных почек.

3. Помещают 4—6 участков стебля основанием **вниз** в среду MSK⁶⁾, в) (приложение 2[II]) так, чтобы пазуха находилась как раз **на** уровне поверхности среды.
4. Инкубируют при 24—26 °С и умеренной освещенности (3000—4000 люкс). Через 2—3 нед из пазухи листа должен развиться один или более побегов. Пазушные побеги можно размножать дальше либо укоренить, как описано выше. Побеги переносят на свежую среду через 1—2 мес или в тот момент, когда растения достигнут верха сосуда, в котором они находятся.

Примечания

- а) Методы размножения известны и для многих других видов [24, 25, 26, 70].
- б) MSK представляет собой типичную среду для размножения и содержит небольшое количество цитокинина кинетина, который способствует сохранению жизнеспособности эксплантата и стимулирует развитие пазушных побегов из предшествующих покоящихся пазушных меристем. Без добавления цитокининов будет развиваться только один, апикально доминирующий побег, уменьшая, таким образом, скорость размножения. Следует отметить, что эти побеги не являются адвентивными и в большинстве случаев представляют собой генетические клоны первоначально трансформированного побега.
- в) Целесообразно включить в среду для размножения бактериостатический антибиотик, чтобы элиминировать любые оставшиеся агробактерии.

Повторное укоренение культивируемых растений в компосте и выращивание их до зрелого состояния

1. Осторожно удаляют укорененные побеги высотой 3—5 см из среды, стараясь не повредить верхушку.
2. Быстро смывают с корней агар и помещают растеньице в отверстие соответствующего размера в заполненном компостом маленьком цветочном горшке^{а)}. Засыпают корни компостом и осторожно уплотняют компост, одновременно аккуратно поддерживая растеньице.
3. Чтобы избежать засыхания, как можно быстрее помещают высаженные растеньица во влажную среду, например в маленький обычный инкубатор, увлажняемую нишу в теплице или пластиковый мешок^{б)}.
4. Выращивают растение при умеренной освещенности (15 000 люкс), пока оно не «закалится», а затем переносят из влажной камеры^{в)} в **закрытую** теплицу или комнату^{г)}.
5. Закрывают мешками распутившиеся цветы, чтобы избежать перекрестного опыления и попадания трансформированной пыльцы в окружающую среду^{а)}.
6. Собирают семена, когда они высохнут (или на соответствующей стадии), и хранят в запечатанных пакетах для семян в прохладном, сухом и закрытом помещении.

Примечания

- a) Когда растения впервые перенесены в компост, целесообразно удалить некоторые из нижних листьев (которые, вероятно, все равно сгниют!) и прикопать стебель на пару сантиметров. Это помогает побегам сохранить прямостоячее положение и укрепляет растение.
- b) Старайтесь, чтобы листья и верхушка не прикасались к компосту и посуду, поскольку они могут прилипнуть к ним, когда растение начнет увядать перед тем, как разовьются корни. Это может повредить растение и повышает его восприимчивость к поражению грибами.
- b) Для многих видов рекомендуется постепенное закаливание, поскольку резкий переход от культиватора с высокой влажностью к относительно сухой атмосфере теплицы может оказаться для растения губительным. Стандартный метод заключается в том, что влажность постепенно уменьшают, проделывая отдушины в контейнере для роста.
- г) Во многих случаях растения, полученные из культуры ткани, проявляют ряд морфологических аномалий, включая уменьшенный размер и атипичную форму листа, измененную длину междоузлий и пониженное число цветков (иногда растения отличаются и пониженной фертильностью). Эти аномалии обычно носят эпигенетический характер и обусловлены тем, что растение регенерировало из культуры, а также стрессом, связанным с повторным укоренением в компосте и переключением на фотавтотрофный рост. Следовательно, прежде чем сделать какие-либо заключения, анализируют морфологию F_1 -проростков, размноженных нормальным образом.
- a) Важно изолировать все трансформированные растения от других трансформированных и нетрансформированных растений, которых они могут перекрестно опылять. Если эта предосторожность не соблюдается, то не только трансформированная пыльца может попасть в окружающую среду, но и (особенно у перекрестно опыляемых растений) опыление индивидуально трансформированного растения пылью другого или пылью растения дикого типа может исказить результаты любых исследований по экспрессии и сегрегации перенесенных генов в F_1 и последующих поколениях.

2.5. Регенерация трансформированных растений через стадию каллуса: трансформация эксплантатов проростков льна

2.5.1. Основные положения

Одна из важнейших задач при разработке методики генетической трансформации любых видов растений заключается в идентификации подходящих эксплантатов, из которых может произойти эффективная регенерация побегов. Обычный подход — это определить эксплантат и комбинации сред, которые стимулируют регенерацию растения путем органо- или эмбриогенеза. Невозможно предсказать условия, приводящие к регенерации побегов у каждого вида, поэтому изложенная ниже методика дает только общие принципы поиска. Как правило, если литература по культивированию какого-либо отдельного вида отсутствует, можно попытаться осуществить регенерацию

путем случайного подбора сред, успешно используемых для других видов. Не существует твердых и простых правил составления оптимальной среды для регенерации, и состав среды можно определить только эмпирическим путем. Однако, как мы уже упоминали в общем введении к данной главе, обнаружено, что определенные типы эксплантатов регенерируют более легко, чем другие. Чаще это гетерогенные эксплантаты, содержащие различные типы клеток, некоторые из них могут реагировать на определенные среды непосредственным формированием зачатков побега или даже эмбриогенезом либо давать начало органогенному или эмбриогенному каллусу. Примеры гетерогенных эксплантатов включают гипокотили, стебли проростков и черешки. Гомогенные эксплантаты, такие, как семядоли, полоски эпидермиса и запасающая паренхима, в норме содержат клетки одного или очень небольшого числа типов и, таким образом, отличаются весьма устойчивой физиологией и имеют тенденцию реагировать на воздействие среды для регенерации по принципу «все или ничего», что часто затрудняет поиск правильной среды для регенерации.

Трансформация через стадию каллуса будет описана на примере проростков льна [10], однако с помощью сходной методики были трансформированы и другие виды (приложение 2[VIII]). В предварительных экспериментах на растениях льна комбинация эксплантатов гипокотыля размером 1—2 мм, вырезанных из стерильных проростков двухдневного возраста, давала наиболее воспроизводимую индукцию каллуса и регенерацию на среде MSD4×2. К сожалению, при всех комбинациях эксплантатов и среды большинство побегов возникает путем прямого формирования зародышей в глубоких клеточных слоях ткани исходного эксплантата. В этом заключена основная трудность, поскольку такие клетки не чувствительны к трансформации агробактериями. Однако часто бывает так, что образовавшийся на эксплантатах каллус, в котором происходит развитие большого числа зачатков побегов, тоже способен к регенерации, особенно если он еще прикреплен к первоначальному эксплантату. Такой каллус, предварительно «заложный» благодаря росту в местах поранения на регенерирующих эксплантатах, может продолжать регенерировать после срезания и переноса на свежую среду для регенерации по крайней мере в продолжение одного или двух пассажей. Способность такого каллуса регенерировать в селективных условиях после удаления из ткани первоначального эксплантата сильно уменьшает вероятность того, что какие-либо регенерирующие побеги могут возникнуть путем непосредственного формирования зародыша без дедифференциации клеток, и, следовательно, более вероятно, что такие побеги трансформированы.

Изложенная ниже методика представляет собой простой путь получения трансформированных растений льна, который исключает непосредственное образование зародышей. В данном эксперименте сначала изучают способность различных эксплантатов проростков льна регенерировать побеги. Затем соответствующие эксплантаты инокулируют агробактериями и отбирают трансформированные каллусы. И наконец, регенерируют побеги из трансформированных тканей.

2.5.2. Получение стерильных проростков льна и регенерация из эксплантатов проростков льна

2.5.2.1. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

- Обычное оборудование для культуры тканей (приложение 2[1]).
- Стерильные банки емкостью 200 мл.
- Семена льна (*Linum usitatissimum*, сорт Antares).
- Эксплантаты (1—2 мм), взятые от двухдневных проростков льна: сегменты гипокотилия, семядолей и кончиков корня.

Растворы

[Ростовые среды для растений (приложение 2[II]), антибиотики (приложение 2[III]).]

- Стерильный вермикулит, смоченный раствором Хогланда, в сосудах Килнера^{а)}.
- Агаризованная среда для регенерации побегов [например, среда MSD4×2 (5 мл) в чашках Петри диаметром 5 см].

2.5.2.2. Методика

Выращивание стерильных проростков льна

Стерильные проростки представляют собой удобный источник растительного материала для экспериментов по трансформации по следующим причинам:

- Не требуются сложные среды для размножения, и количество растений лимитируется только наличием семян.
- Легко следить за стерильностью перед инокуляцией.
- Проростки содержат гетерогенную смесь легко эксплантируемых ювенильных тканей.
- Образование каллуса и регенерация побегов из материала проростков эффективна у многих видов растений.

1. Стерилизуют семена в стерильной банке на 200 мл 10%-ным (вес на объем) раствором коммерческого отбеливателя в те-

чение 20 мин. Время от времени встряхивают, чтобы не допускать прилипания семян друг к другу или к банке.

2. Тщательно ополаскивают 6 раз стерильной водопроводной водой. Удаляют избыток воды и с помощью стерильного шпателя переносят семена в сосуд Килнера, содержащий стерильный вермикулит, смоченный раствором Хогланда^{а)}. Равномерно распределяют семена по поверхности вермикулита с помощью стерильного шпателя. Закрывают крышку банки и инкубируют (24—26°C) при средней освещенности (4000 люкс) с фотопериодом 16 ч.

Регенерация побегов из эксплантатов проростков

1. Через два дня после прорастания переносят проростки льна из стерильной культуры и помещают в стерильную чашку Петри диаметром 9 см.



Рис. 2.10. Влияние происхождения эксплантата на регенерационную способность эксплантатов проростков льна. Различные эксплантаты после четырех недель культивирования на MSD4×2: А — корни, Б — гипокотили, В — семядоли.

2. Нарезают эксплантаты гипокотыля, семядолей и корня длиной 1—2 мм и помещают по 15—20 эксплантатов каждого типа на среду MSD4×2. Инкубируют на свету (3000—4000 люкс) при 24—26°C.
3. Регулярно наблюдают за образованием каллуса и органогенезом на эксплантатах, обращая особое внимание на локализацию и стадию развития любых регенерирующих побегов.
4. На рис. 2.10 показан ответ различных эксплантатов льна при выращивании на среде для регенерации MSD4×2. Ясно, что срезы гипокотыля легче всего дают регенерацию побегов.
5. Более детально развитие побегов из гипокотилей льна иллюстрирует рис. 2.11, А—В. Заметим, что в приведенном эксперименте эксплантаты были инокулированы штаммом агро-

бактерий, и поэтому среда содержит цефотаксим, который не оказывает неблагоприятного влияния на реакцию регенерации. Через три недели эксплантаты образовали каллус по краям среза гипокотыля и произошла регенерация нескольких локализованных побегов (рис. 2.11, А). Через шесть недель эксплантаты покрылись побегами на различных стадиях развития (рис. 2.11, Б). Гистологический анализ показал, что эти побеги развиваются путем прямого формирования зародышей из слоя клеток внутри или вблизи сосудистых тканей.

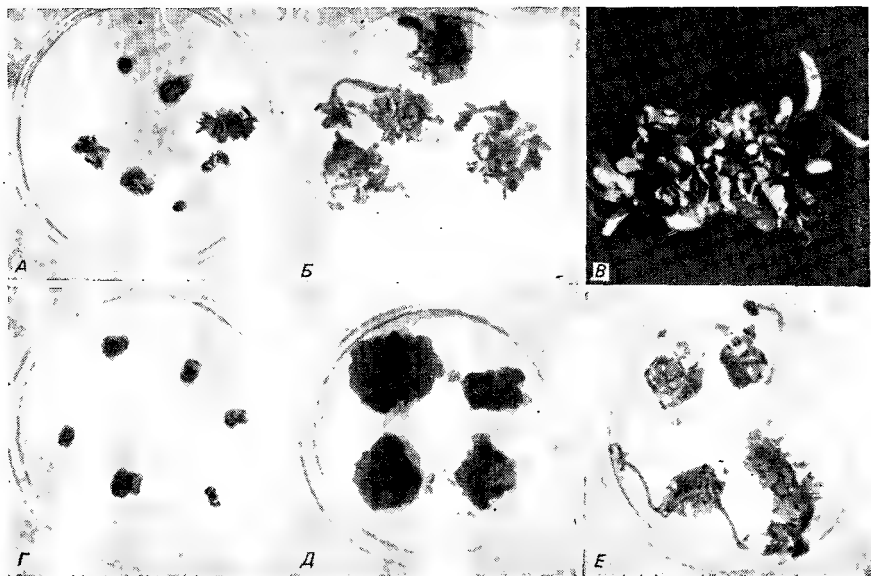


Рис. 2.11. Трансформация гипокотилей льна штаммом *A. tumefaciens* C58C1 (pGV3850::1103). Внешний вид срезов гипокотыля через три (А) и через шесть недель культивирования на среде MSD4×2+200 Сх (Б). В. При увеличении эксплантата (стадия, показанная на фотографии Б) можно увидеть возникновение зародышей побегов. Г—Е. Формирование побегов из гипокотилей льна, инокулированных C58C1 (pGV3850::1103) и инкубируемых на селективной среде MSD4×2+200 Сх+100 Км (соответственно через 2, 4 и 6 нед).

Итак, образование каллуса можно индуцировать по краям среза гипокотыля льна, и бактериостатический агент цефотаксим не влияет на нормальное развитие каллуса, следовательно, эти участки клеточного деления на эксплантатах гипокотыля льна представляют собой источник компетентных клеток для трансформации агробактериями. Цефотаксим мало влияет и на

регенерацию побегов. Однако большинство побегов, образующихся на таких эксплантатах, получены из тканей, нечувствительных к агробактериям.

2.5.3. Трансформация гипокотилей, регенерация из трансформированного каллуса, селекция, размножение и ускорение трансформированных побегов

2.5.3.1 Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для культуры тканей (приложение 2[II]).
- Стерильные проростки льна двухдневного возраста в сосудах Килнера на вермикулите, смоченном раствором Хогланда (разд. 2.5.2.2 и приложение 2[VI]).
- Ночная культура (разд. 1.3) неонкогенного штамма агробактерий с селективным маркерным геном [например, C58C1 (pGV3850::1103) содержит ген *pos-npt-II*, который сообщает трансформированным растительным клеткам устойчивость к канамицину].

Растворы

- Ростовые среды для растений (приложение 2[II]), антибиотики (приложение 2[III]).
- Жидкая среда MSD4×2 для разведения культуры агробактерий.
 - Агаризованная среда для совместного культивирования (например, MSD4×2) и та же среда, содержащая бактериостатический антибиотик (например, Сх) и/или селективный агент (например, Км) для подавления роста агробактерий и отбора трансформированных каллусов. Например:
MSD4×2; по 25 мл в чашках Петри диаметром 9 см (×4).
MSD4×2+Сх (200 мкг/мл); по 5 мл в чашках Петри диаметром 5 см (×10).
MSD4×2+Сх (200 мкг/мл)+Км (100 мкг/мл); то же ×10.
MSD4×2+Км (100 мкг/мл); то же ×4.
 - Среда для роста и дальнейшей селекции срезанных Км^r-каллусов [например, MSD4×2+Сх (200 мкг/мл)+Км (10 мкг/мл); по 5 мл в десяти чашках Петри диаметром 5 см].
 - Среда для размножения трансформированных растений [например, MSFLAX+Сх (200 мкг/мл)+Км (100 мкг/мл); по 40 мл в банках на 200 мл].

- Среда для укоренения трансформированных растений [например, 95-кратная среда B5+Km (100 мкг/мл); по 40 мл в банках на 200 мл или по 60 мл в сосудах Platcons].

2.5.3.2. Методика

Трансформация

1. Подготавливают следующие чашки для инокуляции агробактериями:

Серия А: две чашки диаметром 9 см, содержащие по 20 мл разведенной в 50 раз ночной культуры агробактерий C58C1 (pGV3850::1103) в MSD4×2.

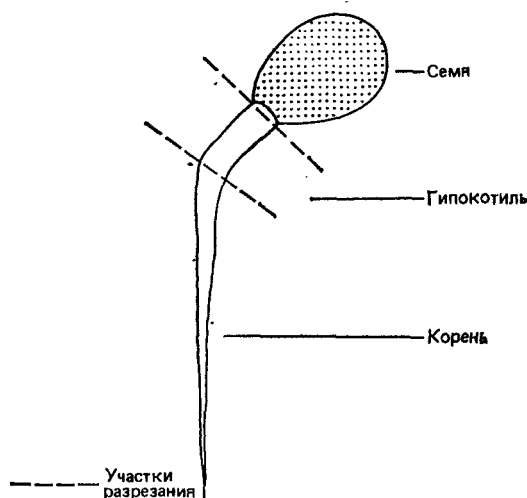


Рис. 2.12. Разрезание проростков льна для получения эксплантатов гипокотилей, которые трансформируют с помощью агробактерий.

Серия Б: две чашки диаметром 9 см, содержащие по 20 мл MSD4×2 (контроль).

2. Соблюдая стерильность, удаляют двухдневные проростки из сосудов Килнера и помещают на стерильную белую кафельную плитку. Не переносят сразу слишком много проростков, поскольку они могут высохнуть.
3. С помощью стерильного пинцета и нового стерильного скальпеля из каждого проростка нарезают сегменты гипокотилей длиной по 1—2 мм, как показано на рис. 2.12. Гипокотили обычно легко узнать по зеленой окраске. Режущие инструменты следует регулярно стерилизовать, смачивая их в спирте, обжигая в пламени горелки и охлаждая перед тем, как

разрезать эксплантаты. Нарезают по 40 сегментов гипокотыля для каждой серии (стадия 1) — всего 80 эксплантатов гипокотыля.

4. Помещают сегменты гипокотыля (20 сегментов на чашку) на чашки, приготовленные, как указано на стадии 1, и оставляют в ламинарном боксе примерно на 2 ч^б).
5. Переносят с помощью стерильного пинцета инокулированные и неинокулированные сегменты гипокотыля с каждой чашки на чашки со средой MSD4×2 (агаризованной, всего 4 чашки) и обматывают края чашек липкой лентой Nescofilm.
6. Инкубируют чашки при 24—26 °С с фотопериодом 16 ч (3000—4000 люкс) от 16 ч (в течение ночи) до 2 сут. Переносят на содержащую антибиотик среду, как описано на стадии 7, прежде чем появятся колонии агробактерий.
7. С помощью стерильного скальпеля переносят все сегменты гипокотыля с одной чашки каждой серии на 5 чашек со средой MSD4×2+Сх, а сегменты гипокотыля с другой чашки каждой серии на 5 чашек со средой MSD4×2+Сх+Км.
8. Обматывают края чашек липкой лентой Nescofilm и инкубируют, как на стадии 6. Периодически наблюдают за развитием побегов и каллуса^в).

Регенерация побегов из трансформированного каллуса

1. Наблюдают за инокулированными (серия А) и контрольными (серия Б на среде MSD4×2+Сх) эксплантатами и определяют, происходит ли нормальное образование каллуса и регенерация после обработки и без обработки агробактериями. Аналогичным образом проверяют контрольные и инокулированные эксплантаты на селективной среде (MSD4×2+Сх+Км) и отмечают появление любого трансформированного каллуса или побегов.

Рис. 2.11, Г—Е иллюстрирует влияние цефотаксима и канамицина на регенерацию побегов и образование каллуса после инокуляции гипокотылей льна штаммом *A. tumefaciens*, несущим селективный маркерный ген Км^r. На рис. 2.11, Г показан внешний вид эксплантатов гипокотыля льна через две недели после инокуляции штаммом *Agrobacterium* C58C1 (pGV3850::1103) и инкубации на среде для селекции трансформантов (MSD4×2+Сх+Км). Обратите внимание на рост Км^r-каллуса на некоторых эксплантатах и на тот факт, что регенерация побегов полностью ингибирована в присутствии канамицина.

2. Осторожно срезают каллус с инокулированных эксплантатов, переносят на свежую селективную среду (MSD4×2+Сх+Км) и инкубируют при 24—26 °С и 3000—4000 люкс (с 16-часовым фотопериодом) в течение 2—6 нед. На рис.

- 2.11, Д показаны резистентные к канамицину каллусы, продолжающие расти на селективной среде. Аналогичным образом переносят все каллусы, образовавшиеся на неинкубированных проростках, на среду MSD4×2+Сх и инкубируют, как описано выше.
3. Отмечают регенерацию побегов из Km^r - и контрольного каллусов. Как показано на рис. 2.11, Е, регенерация побегов из недифференцированных клеток — гораздо более редкое событие, чем формирование побегов из первичных эксплантатов.
4. Важно иметь в виду, что у большинства видов каллус, формирующийся на эксплантатах, помещенных на селективные среды, может лишь частично состоять из трансформированных, резистентных к антибиотику клеток. Таким образом, критический момент — это достижение правильного соотношения ткань:среда, чтобы обеспечить достаточное количество трансформированных клеток. Последние быстро кондиционируют среду и обеспечивают собственный рост, прежде чем токсические соединения (например, полифенолы), выделяемые погибающими нетрансформированными клетками, накопятся в летальных количествах.

Селекция, размножение и укоренение трансформированных побегов

Оценить трансформированный статус любых регенерированных Km^r -побегов можно по их способности к росту в присутствии селективного агента. Однако нетрансформированные организованные ткани, как правило, достаточно устойчивы к тем концентрациям антибиотиков, которые в норме подавляют рост каллуса. Таким образом, трансформированный фенотип должен быть подтвержден при тестировании активности маркерного фермента (например, NPT-II) и выявлении Т-ДНК, как описано в гл. 5 и 6. Однако, чтобы получить достаточное количество материала, необходимо размножить побеги, как описано в следующем разделе.

Следует отметить, что тестирование активности NPT-II и блоттинг-гибридизация по Саузерну в случае Km^r -каллусов льна и регенерированных Km^r -побегов обеспечивает строгое доказательство того, что в описанных выше условиях вырастающий на гипокотелях льна Km^r -каллус представляет собой результат одного или очень небольшого числа первичных событий трансформации и, видимо, целиком состоит из клональных потомков первоначально трансформированных клеток [10].

Кроме того, следует обратить внимание на то обстоятельство, что зародыши побегов, образующиеся на недифференциро-

ванных каллусах, предположительно развиваются из отдельной «активированной» клетки, реагирующей на воздействие среды. Таким образом, при регенерации побегов из гетерогенного (в отношении типа клеток) каллуса на селективной среде эффективно образуются трансформированные клоны. До сих пор не существует доказательств, что из гетерогенной смеси трансформированных и нетрансформированных клеток развиваются химерные побеги.

1. Берут кусочки каллуса с неинкулированных эксплантатов на среде $MSD4 \times 2 + Cx$ и инокулированных эксплантатов на селективной среде ($MSD4 \times 2 + Cx + Km$) и помещают их в чашку Петри.
2. Не захватывая каллус, срезают у основания достаточно большие побеги ($>0,5$ см), чтобы с ними было легко обращаться. Старайтесь не повредить верхушку!
3. Удаляют все листья у основания побега и быстро помещают 3—4 побега основанием вниз в среду $MSFLAX + Cx + Km$.
4. Закручивают крышку сосуда Powder Round, не затягивая полностью, и обматывают края лентой Nescofilm. Инкубируют при $24-27^\circ C$ при умеренной освещенности (4000 люкс) с 16-часовым фотопериодом.
5. Отмечают рост как трансформированных, так и нетрансформированных побегов в течение нескольких последующих недель. Побеги с инокулированных эксплантатов продолжают развиваться, тогда как рост нетрансформированных побегов в течение нескольких дней угнетается и побеги обесцвечиваются.
6. Трансформированные побеги, удлинившиеся на среде $MSFLAX + Cx + Km$, можно размножить вегетативно, срезая секции междоузлий и помещая их обратно на ту же самую среду⁷⁾. Пазушные побеги должны развиваться из пазушных почек на срезах междоузлий в течение 1—2 нед. Селекция и размножение побегов до переноса на среду для укоренения устраняет две проблемы:
 - а) Необходимость получения укоренившихся трансформированных побегов (которые очень трудно получить в случае льна) для вегетативного размножения.
 - б) Использование цефотаксима на стадии укоренения, поскольку любые агробактерии, которые еще растут на регенерированных побегах, будут уничтожены уже во время стадии селекции и размножения.
7. Укореняют побеги, отобранные и размноженные на $MSFLAX + Cx + Km$, путем переноса здоровых пазушных побегов на среду для укоренения льна ($0,5$ -кратная $B5 + Km$)⁸⁾. Отмечают развитие корневой системы в течение последующих 2—3 нед.

8. Переносят побеги в стерильный вермикулит, смоченный раствором Хогланда, сразу же после появления заметного корня^{е)}.
9. Укоренившиеся побеги адаптируют в смеси компост/вермикулит, как описано в разд. 2.4.3. Следует строго соблюдать все предосторожности, предусмотренные этой методикой.

Примечания

- а) Заполняют 1/3 сосуда Килнера вермикулитом и смачивают 100—200 мл раствора Хогланда. Стерилизуют автоклавированием.
- б) См. примечание д в разд. 2.2.3.
- в) Иногда необходимо перенести сегменты гипокотыля на свежую среду, содержащую антибиотики (например, цефотаксим), и продолжить культивирование на этой среде, чтобы подавить рост появляющихся агробактерий.
- г) Методика вегетативного размножения из срезов междоузлий аналогична описанной для табака в разд. 2.4.3. Часто у основания среза междоузлия индуцируется каллус, который может регенерировать побеги через несколько недель, если побег не субкультивируется. Иногда индуцируются корни, и в этом случае побеги можно непосредственно переносить в стерильный вермикулит, а затем в смесь компост/вермикулит без переноса на среду для укоренения.
- д) Важно быть уверенным, что срезаемые пазушные побеги свободны от агробактерий, поскольку среда для укоренения не содержит бактериостатических антибиотиков. Антибиотики полностью ингибируют или замедляют корнеобразование у многих видов. Верхушка побега часто вянет и гибнет на среде для укоренения даже после того, как образовались корни. Однако отсутствие апикального доминирования приводит к росту новых сильных побегов, развивающихся из расположенных ниже пазушных почек. Эти побеги можно срезать для индукции корней или использовать для размножения растения.
- е) Данный этап гарантирует дальнейшее развитие корня и рост побега в отсутствие твердой среды, содержащей гормоны и источник углерода. Это помогает адаптировать побеги к фотоавтотрофному росту и позволяет им быстро приживаться после переноса в смесь компост/вермикулит в теплице.

2.6. Трансформация малых гомогенных эксплантатов

2.6.1. Основные положения

Малые гомогенные эксплантаты могут быть представлены как отдельными клетками или протопластами, так и встречающимися в суспензионных культурах небольшими клеточными агрегатами, образованными различным числом клеток. Популяции таких эксплантатов можно использовать в экспериментах по трансформации, а для манипуляций с ними применять методы, разработанные для бактерий. Эта технология часто упоминается как метод совместного культивирования и включает инкубацию агробактерий совместно с многочисленными попу-

ляциями дедифференцированных растительных клеток в питательной среде часто в течение нескольких дней. Подобные системы имеют практическое значение при необходимости получения большого числа трансформантов. Кроме того, данный метод применяется для решения некоторых специальных задач: мутагенеза генома растения с помощью Т-ДНК в качестве встраивающегося случайным образом мутагенного элемента либо для случайного встраивания беспромоторных доминантных селективных маркерных генов с целью выделения промоторов (см., например, [8]).

Отметим следующие общие свойства малых гомогенных эксплантатов.

1. Доступно большое количество эксплантатов.
2. Популяции протопластов, клеток и клеточных агрегатов обычно относительно гомогенны в отношении типа клеток и их поведения в культуре ткани по сравнению с клетками больших гетерогенных эксплантатов.
3. Во многих системах большинство клеток подвержены делениям и значительная их часть доступна для контакта с агробактериями, а не спрятана глубоко в ткани.
4. Можно поддерживать популяции, содержащие большое количество протопластов, клеток и клеточных агрегатов, разводить в жидкой среде и высевать на чашки или заплывать в слой агара или агарозы в твердых средах; все эти свойства способствуют селекции трансформантов.
5. Рост при низкой плотности клеток можно получить, используя фидерный слой. Это означает, что на последующих этапах селекции «перекрестное питание» или токсические эффекты будут сведены к минимуму и значительно увеличивается вероятность эффективной селекции трансформированных колоний.
6. Колонии, вырастающие из высаженных на чашку клеток, как правило, будут клонально чистыми, и любые побеги, регенерированные из таких тканей, не должны быть химерными.

2.6.2. Разработка систем совместного культивирования

Разработку методов трансформации культуры клеток, равно как и трансформации больших гетерогенных эксплантатов, можно разбить на следующие этапы:

1. Первый и, возможно, наиболее важный этап — это разработка условий культивирования отдельных клеток и небольших клеточных агрегатов, подходящих для экспериментов по трансформации. Важно подобрать среды и условия культивирования, которые допускают низкие плотности посева (10^2 —

10³ клеток/мл) и поддерживают высокую «эффективность высева» (доля **высеянных** на чашку клеток, приступивших к делению).

2. Анализируют рост **высеянных** клеток и определяют время вступления клеток в митоз, чтобы добавить агробактерии именно в тот момент, когда растительные клетки компетентны для трансформации. Это особенно важно для протопластов, которым может потребоваться около недели или более для дедифференциации, восстановления клеточной стенки, начала репликации генома и инициации клеточного деления. Высев на чашку суспензионной культуры с низкой плотностью клеток, как правило, тормозит деление до тех пор, пока клетки не кондиционируют среду, что может занять несколько дней. В большинстве случаев можно использовать фидерный слой, чтобы облегчить рост протопластов или суспензионной культуры с низкой плотностью клеток. Важно детально знать характеристики системы культивирования. Кроме того, система должна быть воспроизводимой, чтобы время, в течение которого живые агробактерии культивируются с растительными клетками, сократить до минимума; иначе бактерии заполняют культуральную среду и вызывают гибель растительных клеток.
4. Оценивают генотип используемых агробактерий, системы *vir*-помощников Ri- или Ti-плазмид, плотность бактериальной суспензии, время совместного культивирования и условия культивирования, обеспечивающие трансформацию, но не ингибирующие рост растительных клеток.
5. Определяют минимальную концентрацию агента для селекции трансформантов (например, канамицина), которая ингибирует рост свежевысеянных клеток, микроколоний, больших колоний, каллуса и регенерируемых побегов.
6. После совместного культивирования определяют стадию развития колоний, на которой можно применять селективное давление при соответствующей концентрации селективного агента, определенной, как указано в п. 5.

Для многих видов сельскохозяйственных растений получение культур быстрорастущих тонких суспензий клеток представляет некоторые трудности и надежное выращивание протопластов почти исключено. В тех случаях, когда удавалось разработать подходящую культуру клеток, часто оказывалось, что эффективно регенерировать побеги невозможно. Кроме того, продолжительное культивирование *in vitro* в недифференцированном состоянии может приводить к необратимым изменениям кариоти-па или генотипа. Культивирование клеток многих сельскохозяйственных растений обсуждается в литературе [25, 26, 70].

В описанных ниже экспериментах рассматривается трансформация клеток, полученных из мезофильных протопластов табака и суспензионной культуры клеток моркови; и то и другое можно считать модельными системами культуры ткани.

1. Совместное культивирование отдельных клеток, полученных из протопластов табака с агробактериями. Клетки высевают на чашки с высокой плотностью с последующей селекцией Km^r-трансформантов при низкой плотности посева и регенерацией побегов табака путем органогенеза.
2. Трансформацию небольших колоний суспензионной культуры клеток моркови, высеваемых с низкой плотностью на «фидерные чашки», путем совместного культивирования с агробактериями с последующей регенерацией растений моркови через соматический эмбриогенез.

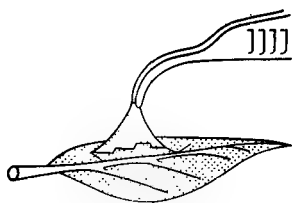
2.7. Выделение мезофильных протопластов табака

2.7.1. Основные положения

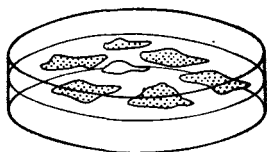
Растительный протопласт — это по существу клетка с удаленной клеточной стенкой. При правильном культивировании протопласты табака, например, будут заново синтезировать клеточную стенку и вступят в митоз. Таким образом, культивирование протопластов — это удобный путь получения популяций, состоящих из отдельных клеток. Процедура выделения протопластов зависит от вида растения и природы исходного материала (например, мезофилл листа, срезы проростков или культивируемые в суспензии клетки). Протопласты обычно высвобождают из растительных тканей путем расщепления клеточной стенки смесью пектиназ, целлюлаз и гемицеллюлаз, растворенных в среде с высоким осмотическим давлением. Такая среда сдерживает тургор и не дает клеткам лопнуть.

Методики выделения протопластов многих видов растений описаны в литературе [26, 32]. На рис. 2.13 представлена общая схема выделения протопластов из растительных тканей. У многих видов культурных растений не определены благоприятные условия для восстановления клеточной стенки и последующего деления выделенных протопластов. В случае других — сообщалось о низкой частоте деления. Отметим, что для трансформации необходимо использовать достаточно жизнеспособные протопласты, чтобы они могли пережить совместное культивирование с агробактериями или физические методы введения ДНК, например микроинъекцию, электропорацию и химически индуцированный эндоцитоз (гл. 3). Напомним, что разработка эффективной системы получения протопластов у ранее неизучен-

А Мезофильная
ткань листа

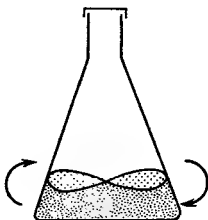


Стерилизуют
поверхность листа
и удаляют нижний слой
эпидермиса



Кусочки листа помещают
(неповрежденной стороной **вверх**)
на раствор ферментов

Б Суспензионная
культура

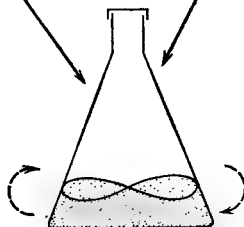


Удаляют
питательную
среду

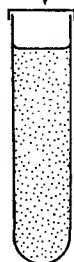
В Стерильный проросток:
» ткань семядоли/корня



Приготавливают
тонкие срезы



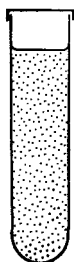
Клетки/протопласты/ткань
добавляют к раствору фермента
и инкубируют при медленном
круговом вращении



Дважды
отмывают
в среде
для выделения
протопластов
(без фермента)



Ресуспандируют
в ростовой среде.
Отмывают.
Ресуспандируют
в ростовой среде



Подсчитывают количество
протопластов, доводят плотность
и высевают на чашку в жидкой
среде поверх агаризованной
твердой среды



Фильтруют
через тонкое сито
и собирают на дне
центрифужной
пробирки

Рис. 2.13. Методы выделения, очистки и посева на чашки протопластов, полученных из различных источников.

ных видов (или даже различных разновидностей одного и того же вида!) требует больших временных затрат и значительных усилий и должна проводиться только в том случае, если другие пути получения трансформантов не увенчались успехом. В частности, до сих пор не удавалось эффективно регенерировать нормальные побеги из протопластов основных видов злаковых и зерновых бобовых культур. Кроме того, регенерация побегов остается проблематичной для многих овощных и фуражных бобовых культур, несмотря на то что для них были успешно разработаны системы протопластов. В приведенном эксперименте в качестве модельной системы используется выделение и культивирование мезофильных протопластов из листьев *N. tabacum* (сорт SR1).

2.7.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычные материалы для культуры тканей (приложение 2[1]).
- Листья табака сорта SR1 или Xanthi (еще не вполне распустившиеся).
- Гемоцитомер (конструкции Фукса — Розенталя).
- Инвертированный фазово-контрастный микроскоп с объективами $\times 10$, $\times 20$ и $\times 40$, Nikon Diaphot (или эквивалентный).
- Дощечки с названием растения.
- Термостат на 25°C без освещения.
- Настольная центрифуга MSE Centaur 2 (или эквивалентная) с бакет-ротором для центрифужных пробирок, описанных ниже.
- Стерильные центрифужные пробирки (например, пробирки из пирекса с закручивающимися крышками 16×120 мм или полистироловые пробирки Sarstedt, тип 55.468/001, 16×95 мм).
- Стерильный пластиковый одноразовый шприц на 60 мл.
- Стерильное нейлоновое сито с ячейками размером 64 мкм (или эквивалентное).
- Большой стерильный плоский сосуд из пирекса (Pyrex casserole dish — Corning).

Растворы

(См. приложение 2 [II и V] — растворы для выделения протопластов и культуральные среды.)

- Раствор для отмывания протопластов (например, CPW13M), 100 мл, $\times 2$.

- Раствор ферментов для выделения протопластов, 20 мл, $\times 2$.
- Жидкая среда для культивирования протопластов (например, MSP1 9M для табака), 100 мл, $\times 2$.
- Агаризованная (0,8%) среда для культивирования протопластов (например, MSP1 9M для табака) по 5 мл в чашках Петри диаметром 5 см, $\times 6$.

2.7.3. Методика

1. Срезают почти полностью распустившиеся листья с растений табака двухмесячного возраста.
2. Стерилизуют листья, погружая их на 20 мин в 10%-ный (вес на объем) коммерческий отбеливатель (например, Domestos), а затем ополаскивают 5 раз в 400 мл стерильной водопроводной воды. Для стерилизации удобен автоклавированный сосуд из пирекса.
3. Дают листьям подсохнуть в потоке воздуха ламинарного бокса. Переносят листья (нижним эпидермисом вверх) на стерильную белую кафельную плитку и тонким пинцетом удаляют нижний эпидермис^{а)}.
4. Оставляя центральные жилки, вырезают участки листовой пластинки (с которых удален эпидермис) и подвергают клетки плазмолизу. Для этого кусочки листа с незащищенным мезофиллом помещают на поверхность среды CPW13M (30 мл), находящейся в чашке Петри диаметром 14 см. Постоянно следят за тем, чтобы кусочки листа не высохли.
5. Когда чашка будет полностью заполнена кусочками листьев, с помощью стерильного шприца на 60 мл удаляют CPW13M и заменяют ее на 20 мл смеси ферментов^{б)}. Инкубируют в темноте (25 °C, 16—18 ч).
6. Высвобождают протопласты из ткани путем осторожного перемешивания расщепленных кусочков листа в чашке Петри с помощью пастеровской пипетки, длинного пинцета или шпателя. Наклоняют чашку и удаляют большие агрегаты дебриса из суспензии протопластов с помощью стерильного пинцета. Пропускают суспензию через стерильное сито с отверстиями 64 мкм в другую чашку Петри.
7. Стерильным шприцем на 60 мл переносят протопласты в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой. Центрифугируют при 400 об/мин (5 мин) в центрифуге MSE Centaur 2 (или эквивалентной), чтобы осадить протопласты.
8. С помощью пастеровской пипетки осторожно ресуспендируют осадок протопластов в CPW13M. Переосаждают протопласты центрифугированием при 400 об/мин (5 мин).
9. Дважды отмывают протопласты путем осаждения и ресуспендирования в MSP1 9M^{в)}.

10. Ресуспендируют протопласты в 5 мл (или другом подходящем объеме) среды MSP1 9M и подсчитывают число жизнеспособных протопластов с помощью гемоцитометра^{г)}. Мезофильные протопласты листьев табака показаны на рис. 2.14, А. Обратите внимание на фенотип жизнеспособных протопластов (рис. 2.14, Б)^{г)}.
11. Пластиковую чашку Петри диаметром 5 см заливают 5 мл 0,8%-ной агаризованной среды MSP1 9M. Затем на чашку высевают протопласты в 2,5 мл жидкой MSP1 при концентрации около $1,5 \times 10^5$ живых клеток в 1 мл. Конечная плотность посева составляет 5×10^4 клеток в 1 мл.
12. Инкубируют (в темноте, 25°C) и ежедневно наблюдают за протопластами (см. разд. 2.8).

Примечания

- а) Удаление нижнего эпидермиса — это трудоемкая и требующая большого мастерства процедура. Награда за терпение заключается в том, что полученные при этом популяции протопластов, как правило, содержат высокий процент жизнеспособных клеток. Описаны альтернативные способы быстрого выделения протопластов, в которых используют мелко нарезанные кусочки листа стерилизованных выращенных в теплице или размножаемых *in vitro* растений. С одной из таких методик читатель может ознакомиться в приложении 2[VI]. Популяции протопластов, выделенных быстрыми методами, обычно содержат много мертвых клеток и дебрис, однако, тем не менее, вполне пригодны для трансформации путем совместного культивирования с агробактериями.
- б) Эта смесь ферментов может быть использована только для выделения мезофильных протопластов табака. Подходящий ферментный «коктейль» при выделении протопластов из нового типа эксплантата, нового вида растения или даже разновидности каждый раз приходится составлять заново. В целом, изменение для растения условий роста предусматривает и изменение в смеси ферментов, необходимой для хорошего выхода жизнеспособных протопластов, способных к образованию клеточной стенки и делению.
- в) Протопласты некоторых видов растений значительно повреждаются при выделении; в этом случае целесообразно отделять интактные клетки от разрушенных. При работе с *Nicotiana tabacum* можно ресуспендировать протопласты в CPW21S (приложение 2[V]) и центрифугировать при 400 об/мин в течение 10 мин. В результате центрифугирования интактные протопласты формируют компактную зону на поверхности среды CPW21S, тогда как более плотные разрушенные протопласты и дебрис осаждаются. Протопласты можно отобрать пастеровской пипеткой и развести в MSP1 9M. Однако протопласты многих растений чувствительны к высоким концентрациям сахарозы, а других — имеют слишком высокую плотность, чтобы флотировать, и, таким образом, дальнейшая их очистка невозможна.
- г) Жизнеспособные протопласты имеют сферическую форму, а их хлоропласты сохраняются в интактном виде (имеют овальную форму) и распределены в цитоплазме равномерно (рис. 2.14, Б). Нежизнеспособные протопласты часто становятся несферическими и содержат бесформенные хлоропласты, собранные в группу у одной стороны клетки (на рис. 2.14 отмечены стрелками).

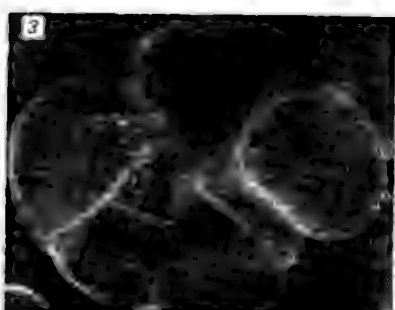
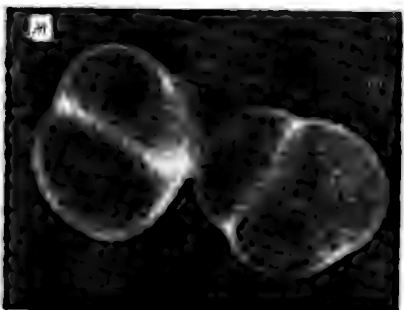
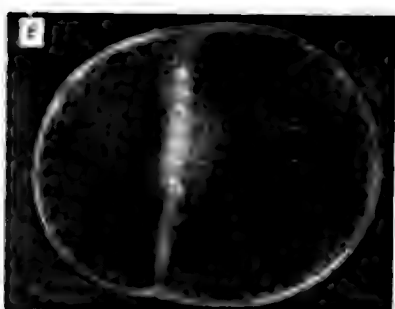
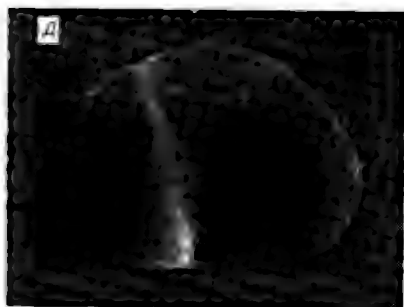
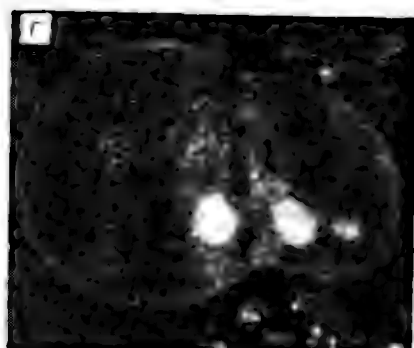
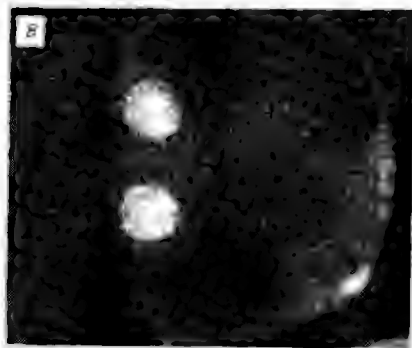
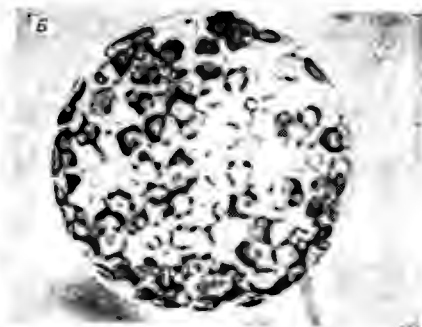
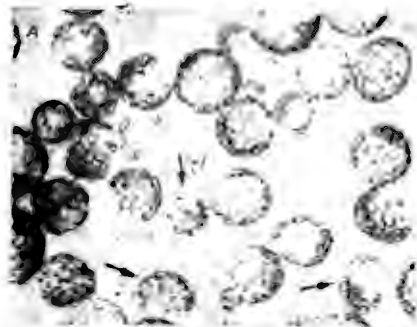


Таблица 2.2. Ключевые стадии развития протопластов

Цитологически различимые фазы, в которых находится большинство клеток	Дни в культуре
Расширение протопластов	1—2
Потеря сферической формы, указывающая на регенерацию клеточной стенки	2—4
Миграция: хлоропласты более равномерно окружают цитоплазму	2—6
Деление ядра	4—6
Формирование клеточной пластинки	5—8
Первое деление	6—10
Второе деление	8—12
Формирование микроколоний	14—20

2.8. Культивирование мезофильных протопластов табака

2.8.1. Основные положения

Необходимо идентифицировать ключевые стадии в процессе развития протопластов, чтобы, во-первых, определить, происходит ли нормальный рост клеток в какой-либо популяции протопластов (рис. 2.14), и, во-вторых, чтобы быть уверенным, что агробактерии вводятся в культуру именно в тот момент, когда растительные клетки приобрели компетентность.

Что касается первого требования, то можно следить за стадиями (хронологический порядок которых приведен в табл. 2.2) во время становления культуры протопластов и подсчитать процент жизнеспособных клеток на каждой стадии в любой клеточной популяции.

Увеличение размеров протопластов, миграция хлоропластов, первое и второе деления и формирование колоний — все эти процессы можно наблюдать с помощью фазово-контрастного мик-

←

Рис. 2.14. Развитие протопластов табака в жидкой культуре. А. Типичные свежeweделенные мезофильные протопласты табака. Обратите внимание на внешний вид поврежденных протопластов (отмечены стрелкой). Б. Свежeweделенный и жизнеспособный протопласт при большем увеличении. Хлоропласты равномерно распределены по его периферии. В. Протопласт, окрашенный акридиновым оранжевым после деления ядра и непосредственно перед делением клетки. Г. Дочерние клетки вскоре после деления. Д—З. Внешний вид клеток, окрашенных тионалом. Д. У протопластов в возрасте 5—7 дней можно увидеть начало формирования клеточной пластинки. Е. Завершение первого клеточного деления. Ж. Второе деление через 10 дней культивирования. З. Небольшая колония клеток через 14 дней культивирования.

роскопа, часто с помощью инвертированного микроскопа, чтобы не открывать чашки с культурами. Наблюдения за регенерацией клеточной стенки, делением ядра и формированием клеточной пластинки можно проводить под флуоресцентным микроскопом после окрашивания части клеток соответствующим красителем (приложение 2[VII]). Такие красители избирательно связываются с нуклеиновыми кислотами (рис. 2.14, В—Г) или новообразованным материалом стенки (рис. 2.14, Д—З).

Наблюдение за цитологическими изменениями, происходящими в культуре, позволяет предсказать тот момент, когда большая часть популяции вступит в определенную фазу клеточного цикла. Например, во время первого клеточного деления важно определить, когда большая часть популяции вступает в стадию цитокинеза и S-фазу, и, следовательно, клетки становятся компетентными для трансформации агробактериями.

2.8.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычные материалы для культуры тканей (приложение 2[I]).
- Инвертированный микроскоп Nikon Diaphot с флуоресцентной приставкой (приложение 2[VII]).
- Предметные и покровные стекла для микроскопа.
- Пластилин.

Растворы

- Раствор акридинового оранжевого
 - Раствор тинопала
 - Раствор диацетата флуоресцеина
- } приложение 2[VII].

2.8.3. Методика

1. Ежедневно наблюдают за культурой протопластов с помощью инвертированного микроскопа. Оценивают процент протопластов, для которых характерны определенные процессы (разд. 2.8.1), например образование стенки, первое деление и т. д.
2. С помощью пастеровской пипетки отбирают небольшие образцы протопластов из культур различного возраста. Помещают каплю (0,1—0,25 мл) культуры на предметное стекло и быстро (чтобы предотвратить высыхание) накрывают покровным стеклом, которое с каждого угла поддерживается маленьким кусочком пластилина. Для ранних культур важно поддерживать покровное стекло, чтобы предохранить протопласты от разрушения, поскольку они не полностью восстановили клеточную стенку.

3. Окрашивают небольшие образцы протопластов, как описано в приложении 2[VII], и оценивают:
 - а) Средний процент выживаемости протопластов.
 - б) Среднюю эффективность посева (долю жизнеспособных клеток, прошедших хотя бы одно клеточное деление).
 - в) Время проявления первых признаков формирования клеточной стенки.
 - г) Время первого клеточного деления.
 - д) Время первого цитокинеза.
 - е) Время второго деления.
4. Начинают совместное культивирование, когда клеточная популяция становится компетентной для трансформации (разд. 2.9).

2.9. Трансформация протопластов путем совместного культивирования с агробактериями

2.9.1. Основные положения

В процессе образования корончатого галла агробактерии способны трансформировать клетки, прилежащие к поврежденной ткани, которые претерпевают клеточные деления в ответ на поранение. Клетки интактного растения, как правило, проявляют максимальный онкогенный ответ на инфекцию *A. tumefaciens* между 1,5 и 3 днями после поранения. У различных видов эта «компетентная» фаза совпадает с первыми клеточными делениями в ответ на поранение. Как было показано [50], раневой ответ можно имитировать в культуре тканей, если превратить покоящиеся мезофильные клетки листа или активно делящиеся клетки суспензионной культуры в протопласты и индуцировать регенерацию клеточной стенки и клеточное деление в соответствующей среде. В определенной фазе становления культуры протопластов клетки компетентны для трансформации *A. tumefaciens*. Технология совместного культивирования предусматривает инкубацию протопластов в присутствии агробактерий в соответствующей жидкой питательной среде и позволяет получать большое число трансформантов в контролируемых условиях. Варьируя условия культивирования, плотность посева и изменяя процедуру селекции, можно получить трансформированные колонии клонального происхождения. Важно иметь в виду, что корончатые галлы — это смесь нетрансформированных и различных типов независимо трансформированных клеток и, следовательно, фенотип галла представляет собой сумму фенотипов всех клеток, обнаруживаемых в опухоли. Однако клеточная популяция трансформантов, полученных с помощью сов-

местного культивирования, однородна, и, таким образом, маскирующие фенотипы не появляются. Это позволяет проводить селекцию и анализ экспрессии генов без значительных артефактов. Трансформированные колонии можно отбирать на основе гормонезависимого роста, когда используют *opc*⁺-векторы, или путем селекции на среде, содержащей антибиотика (когда используют *opc*⁺- или *opc*⁻-векторы, имеющие доминантные селективные маркеры, например гены резистентности к канамицину).

Во введении к данной главе мы уже обсуждали различные этапы разработки системы трансформации, использующей большие популяции малых эксплантатов, таких, как полученные из протопластов клетки.

2.9.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычные материалы для культуры тканей (приложение 2[1]).
- Пластиковые чашки Петри диаметром 5 см, содержащие культуры клеток, полученные из протопластов табака, как описано в разд. 2.7 и 2.8.
- Ночная культура штамма агробактерий несущего неонкогенный Ti-плазмидный вектор с Km^r-геном [например, LBA4404 (pBin 19); разд. 1.3].
- Инвертированный микроскоп (например, Nikon Diaphot или эквивалентный).
- Настольная центрифуга с бакет-ротором, подходящим для центрифужных пробирок, описанных ниже (например, MSE Centaur 2 или эквивалентная).
- Центрифужные пробирки (стерильные; Sarstedt, тип 55.468/001, 16×95 мм)×12.
- Штатив для центрифужных пробирок.
- Предметное стекло для подсчета колоний (тип Sedgwick-Rafter).
- Дощечки с названиями растений.

Растворы

Культуральные среды для растительных клеток (приложение 2[11]).

- Жидкая среда, содержащая бактериостатический антибиотик для удаления агробактерий из клеточных культур после совместного культивирования, 100 мл [например, для протопластов табака, инкубированных с LBA4404(pBin19), используют MSP1 7M+Cb (500 мкг/мл)].

- Агаризованная (0,8%) MSP1 7M+Cb (500 мкг/мл); по 5 мл в чашках Петри диаметром 5 см, $\times 4$. Заметьте, что вместо Cb для штаммов, отличающихся от LBA4404(pBin19), могут использоваться другие антибиотики.
- Агаризованная (0,8%) среда для высева микроколоний для контролирования выживаемости после совместного культивирования с агробактериями; 100 мл, расплавленная, при температуре 40°C [например, для микроколоний табака ранее совместно культивированных с LBA4404(pBin19) используют MSP1+Cb (250 мкг/мл)].
- Агаризованная (0,8%) среда для селекции трансформированных микроколоний; 100 мл, расплавленная, при температуре 40°C [например, для Km^r-микроколоний табака используют MSP1+Cb (250 мкг/мл) + Km (100 мкг/мл)].
- Чашки с агаризованной селективной средой; по 12 мл в чашках Петри диаметром 9 см, $\times 8$ [например, для Km^r-микроколоний табака используют MSP1+Cb (250 мкг/мл) + Km (100 мкг/мл)].
- Агаризованная (0,8%) среда для роста трансформированного каллуса в отсутствии селекции; по 12 мл в чашках Петри диаметром 9 см, $\times 8$ [например, для каллуса табака используют MSP1+Cb (250 мкг/мл)].
- Среда для регенерации побегов из трансформированного каллуса; 25 мл в чашках Петри диаметром 9 см, $\times 4$ [например, для трансформированного каллуса табака используют MSD4 $\times 2$ + Km (100 мкг/мл)].

2.9.3. Методика

Инокуляция полученных из протопластов клеток агробактериями

Клетки считаются компетентными для трансформации, когда в них начинается репликация ДНК. Синтез ДНК во многих системах протопластов начинается одновременно с регенерацией клеточной стенки во время первого деления, но такие клетки, как правило, слишком слабые, чтобы пережить совместное культивирование с агробактериями. Во многих случаях целесообразно инокулировать культуры агробактериями, когда большинство клеток в популяции вступает во второй период синтеза ДНК перед вторым делением. В случае мезофильных протопластов табака, выделенных из тепличных растений, эта стадия наступает через 6—8 дней культивирования.

1. Чтобы увидеть формирование клеточных пластинок, наблюдают за развитием протопластов, окрашивая клетки тинопалом (разд. 2.8, приложение 2[VII]). Когда 20—30% кле-

ток завершат первое деление, культура готова к инокуляции агробактериями (рис. 2.14, Д—З).

2. С помощью стерильной пастеровской пипетки добавляют к протопластам две капли ночной культуры штамма *Agrobacterium* LBA4404 (pBin19) в соотношении около 100 бактерий на клетку. Обязательно ставят неинокулированный контроль!
3. Обматывают края чашек лентой Nescofilm и инкубируют в темноте при 24—26 °С в течение 36—48 ч^{а)}.

Наблюдения, отмывание и удаление агробактерий

Во время совместного культивирования растительных клеток и бактерий, как правило, образуется пленка растительных клеток, связанных с бактериальными агрегатами (рис. 2.15)^{б)}. Последующие процедуры направлены на осторожное разрушение этих агрегатов, чтобы наиболее эффективно отобрать клонально полученные трансформанты и смыть как можно больше контаминирующих агробактерий.

1. Наблюдают за совместным культивированием с помощью инвертированного микроскопа.
2. Разделяют слипшиеся растительные клетки путем осторожного пипетирования. Переносят клетки из каждой чашки в отдельную центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой. Открывают крышки и уравнивают пробирки раствором MSP1 7M. Осаждают клетки центрифугированием при 400 об/мин в течение 5 мин в настольной центрифуге (например, MSE Centaur 2).
3. Ресуспенсируют осадок клеток в MSP1 7M, содержащей 1 мг/мл карбенициллина^{в)} (или другого соответствующего антибиотика в зависимости от использованного штамма агробактерий), и снова центрифугируют.
4. Окончательно ресуспенсируют клетки в 5 мл жидкой MSP1 7M, содержащей соответствующие антибиотики (например, 1 мг/мл карбенициллина)^{в)}. Высевают клетки на чашку поверх 5 мл той же самой агаризованной (0,8%) среды и инкубируют^{в)}.
5. Через 7—10 дней последующего роста клетки должны восстановиться после совместного культивирования, и их переносят на среду MSP1 3M, содержащую антибиотики, и инкубируют еще в течение недели до начала селекции.

Примечания

^{а)} При необходимости продолжительность периода совместного культивирования может быть увеличена при использовании более низких температур (15 °С). Одновременно следует уменьшить плотность инокулята.

- 6) Чрезмерное слипание растительных клеток может быть связано с генотипом используемого штамма агробактерий или концентрацией либо исходного инокулята, либо конечной бактериальной массы в культуральной среде. Для уменьшения слипания можно принять следующие меры:

1) Взять штамм агробактерий с другим генотипом.

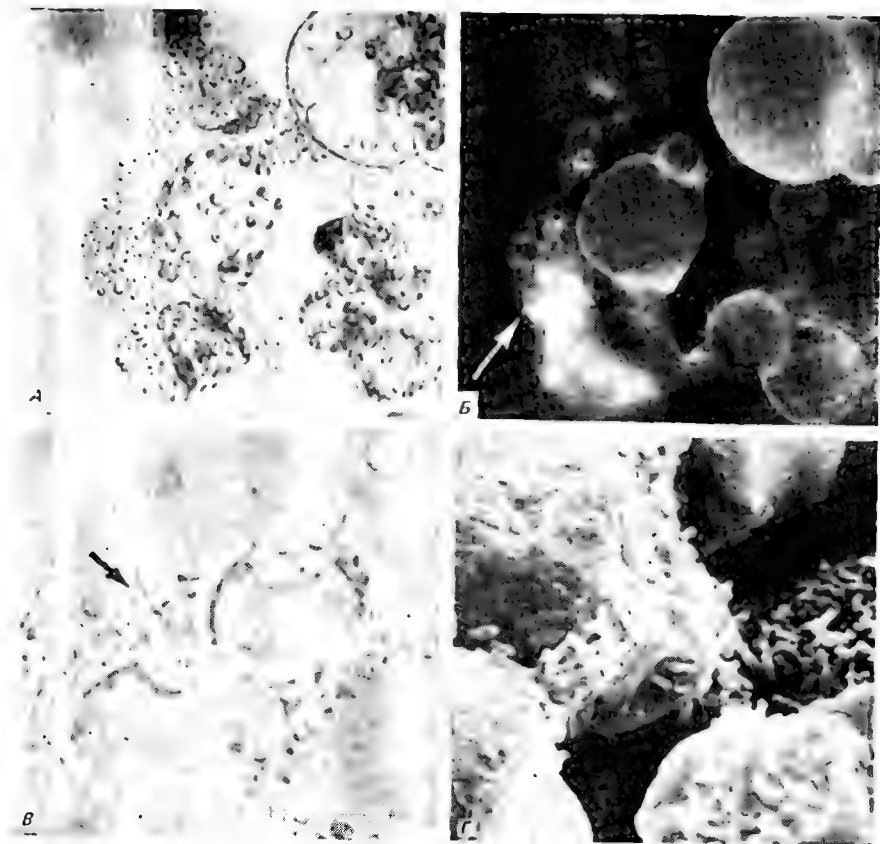


Рис. 2.15. Взаимодействие растительных клеток и агробактерий при совместном культивировании. А. В присутствии пораженных растительных клеток агробактерии образуют большое число целлюлозных фибрилл, которые вызывают соединение клеток. Б. Окрашивание специфичным для целлюлозы красителем — тиниопалом — ясно демонстрирует состав фибрилл. Прикрепление агробактерий к поверхности растительной клетки, которое можно наблюдать с помощью фазово-контрастного ($\times 1300$, В) и сканирующего электронного микроскопов ($\times 15\,000$, Г).

- 2) Использовать инокулят меньшей плотности.
 3) Сократить время совместного культивирования.
- 6) Режим обработки антибиотиками для удаления агробактерий из тканей корончатых галлов (приложение 2(III)) можно использовать и для по-

давления роста агробактерий в экспериментах по совместному культивированию. Однако иногда необходимо подобрать оптимальные концентрации антибиотиков, поскольку системы протопластов часто более чувствительны к ним, чем ткани корончатых галлов или косматого корня.

- *) Если во время совместного культивирования происходит значительная гибель клеток, то снова доводят плотность высева на чашки (приблизительно до 5×10^4 клеток/мл).

Селекция трансформированных колоний

Колонии трансформированных растительных клеток можно отбирать или путем высева на безгормональные среды в случае *опс*⁺-векторов, или путем высева на среды, содержащие в норме высокие концентрации токсичных антибиотиков, если в *опс*⁻-векторы включены доминантные селективные маркерные гены (например, резистентности к канамицину). Известно несколько важных моментов, касающихся условий селекции.

Во-первых, микроколонии должны иметь достаточный размер, чтобы их можно было высевать при низких плотностях. Например, полученные из протопластов микроколонии табака трехмесячного возраста, изображенные на рис. 2.16, А, находятся на подходящей стадии для начала селекции. При слишком высокой плотности колонии прорастают друг в друга, что затрудняет получение клонального материала, а также создает проблемы из-за перекрестного питания.

Во-вторых, условия селекции должны быть такими, чтобы массовый некроз нетрансформированного материала не ингибировал рост трансформированных колоний. Таким образом, может быть целесообразна первичная селекция на средах, содержащих пороговые ингибирующие концентрации антибиотиков, в особенности если протопласты не отличаются высокой жизнеспособностью. Предполагаемые трансформанты можно отобрать и перенести на среды, содержащие оптимальные концентрации селективного агента.

В-третьих, собственная устойчивость колонии растительных клеток к токсичным антибиотикам с увеличением размера (возраста) колонии, как правило, повышается.

Приведенные выше соображения в равной степени относятся к выделению трансформантов из клеточных суспензий, совместно культивированных с *Agrobacterium tumefaciens* (разд. 2.10), и популяций протопластов, трансформированных путем прямого поглощения векторной ДНК (гл. 3). Описанные методы можно применять для селекции трансформированных колоний во всех экспериментах, подразумевающих использование больших популяций малых гомогенных эксплантатов.

1. С помощью пастеровской пипетки переносят микроколонии в стерильные центрифужные пробирки и осаждают (400 об/мин, 2 мин) или дают колониям отстояться.

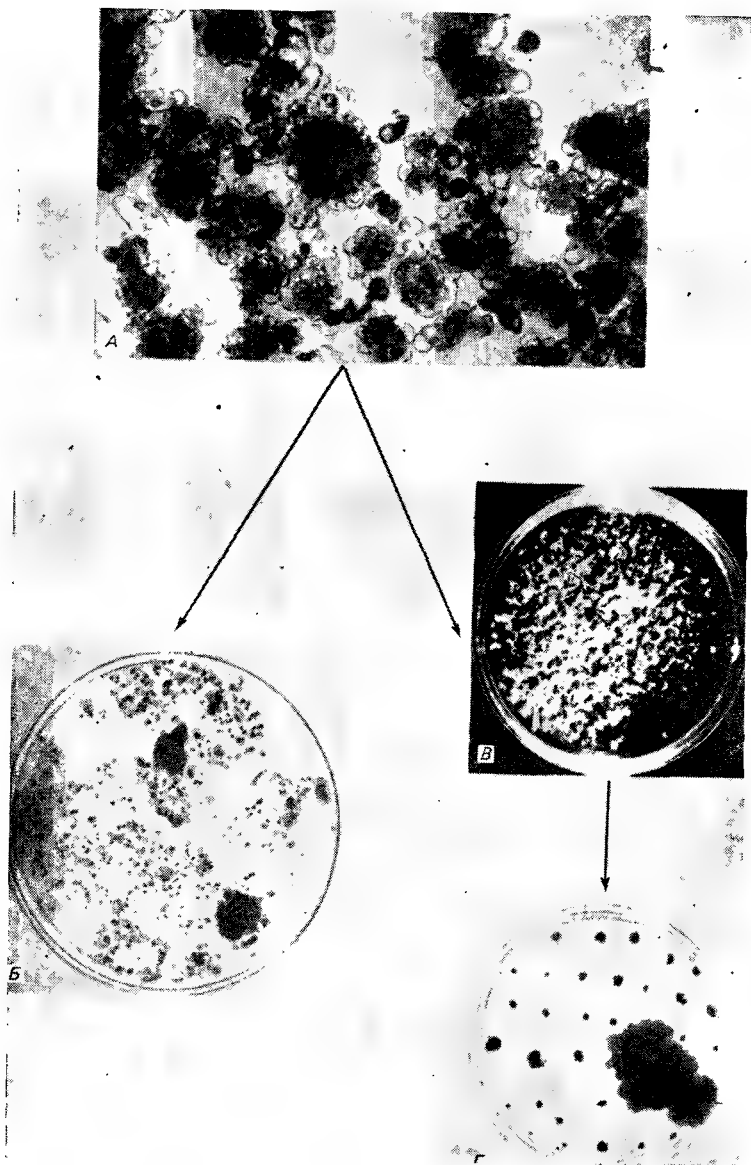


Рис. 2.16. Селекция трансформированных колоний табака. А. Полученные из протопластов микроколонии трехнедельного возраста на стадии, удобной для селекции. Б. Селекция трансформантов путем культивирования в агарозной капле. Можно использовать и двухстадийный метод. В. Селекция трансформантов путем вплавления микроколоний в неселективную среду; из микроколоний сначала выращивают макроколонии размером 2—3 мм. Затем вручную переносят макроколонии на селективную среду. Г. Показан интенсивный рост трансформантов через 2—3 нед.

2. Отмывают микроколонии культуральной средой (например, MSP1 для табака) и ресуспендируют в 10 мл (или любом другом подходящем объеме) среды.
3. Посчитывают число колоний в 1 мл с помощью предметного стекла для подсчета колоний. Стараются взять репрезентативные образцы, поддерживая равномерное распределение клеток в суспензии.
4. Заливают колонии (500 колоний на 1 мл^{а)}) в 10 мл агаризованной среды для селекции трансформантов [например, для табака используют MSP1+Km (100 мкг/мл)+Cb (250 мкг/мл)]^{б)} в чашке Петри диаметром 9 см. Высевают и некоторое количество микроколоний в той же среде, но без селективного агента [например, MSP1+Cb (250 мкг/мл)] для контроля выживаемости. Высев на чашки осуществляют одним из двух способов:
 - а) Готовят необходимое число микроколоний для одной чашки Петри диаметром 9 см (5000 колоний) в теплой (37°C) центрифужной пробирке. Удаляют среду, заменяют на 8 мл расплавленной селективной среды (40°C), встряхивают круговым движением для перемешивания и немедленно выливают на поверхность селективной чашки.
 - б) Дают микроколониям осесть в центрифужной пробирке, а затем удаляют большую часть супернатанта. Решают, на сколько селективных чашек распределить микроколонии из эксперимента по совместному культивированию. Распределяют микроколонии в каплях по необходимому числу чашек. Быстро добавляют 7 мл селективной среды (например, MSP1+Cb+Km; 40°C), а затем, прижимая дно чашки Петри к рабочей поверхности ламинарного бокса, покачивают чашку из стороны в сторону, чтобы равномерно распределить колонии, пока среда не застынет.
5. Обматывают края чашки лентой Nescofilm, а затем инкубируют на свету (4000—5000 люкс) при 24—28°C^{в)}. Культивируют в течение 3—6 нед, наблюдая за ростом резистентных к канамицину колоний^{г)}, и оценивают частоту трансформаций.

Примечания

а) Плотность высева микроколоний следует скорректировать в зависимости от:

1) ростовых потребностей используемых видов растений;

2) среднего числа клеток в микроколониях (размера). Важно учесть, что не все культуры клеток могут развиваться с одинаковой скоростью, и, следовательно, время применения селективного давления будет варьировать у разных видов, разновидностей и даже различных препаратов протопластов одного и того же сорта;

- 3) используемой среды. В некоторых случаях можно добиться успеха при использовании среды, специально предназначенной для культивирования микроколоний при низких плотностях высева (например, 10^3 колоний на чашку, см. [16], приложение 2 [11]);
- 4) необходимости достижения такой плотности высева, при которой не происходит перекрестного питания, или слишком тесного расположения колоний в процессе подрастания трансформантов.
- 6) Концентрация используемого селективного агента (антибиотика или гербицида) будет зависеть от размера микроколоний и плотности высева; когда на чашках образуется небольшое число клеток, их первоначальная жизнеспособность останется пониженной до тех пор, пока среда не кондиционируется.
- 8) Если происходит массовый некроз микроколоний на селективных чашках при всех плотностях высева, то альтернативный путь — это высевать микроколонии с низкой плотностью на *неселективной* среде (рис. 2.16, В), а затем после дальнейшего подрашивания перенести случайно выбранные микроколонии на селективные чашки (рис. 2.16, Г) или идентифицировать трансформанты с помощью процедур скрининга. Чтобы быть эффективной, эта альтернативная технология «массовой селекции» требует достаточно высокой частоты трансформации (около 1% или более).
- 9) Разработаны различные процедуры, облегчающие процесс селекции, особенно перенос совместно культивированных клеток на селективную среду (рис. 2.17), в том числе:
 - 1) Использование фидерных культур и «переносных дисков», чтобы обеспечить совместное культивирование при низких плотностях клеток и создать твердую подложку колониям, которую легко можно переносить с одной среды на другую, не нарушая расположение колоний [41]. Эта технология используется при трансформации клеточных суспензий (разд. 2.10).
 - 2) Метод культивирования в «агарозных каплях» [59] основан на «вкраплении» совместно культивированных клеток с низкой плотностью в диски среды, застывшей благодаря добавлению агарозы; диски затем можно переносить в жидкую среду, как содержащую, так и не содержащую селективные агенты (рис. 2.16, Б). Это позволяет легко менять среду. Диски обычно аэрируют с помощью легкого покачивания чашки.

Регенерация растений табака из каллуса

1. Когда трансформированные колонии достигнут диаметра 1 см или более, переносят каждый каллус на среду для регенерации (например, MSD4×2+Km для трансформированного каллуса табака^{а)}) в отдельные сосуды для роста (стандартные пробирки или чашки Петри диаметром 5 см), чтобы индуцировать побеги^{б)}.
2. Инкубируют при 24—26 °C и освещенности 4000—5000 люкс в течение 2—4 нед и периодически наблюдают регенерацию побегов^{в), г)}.
3. Регенерированные побеги можно размножить, укоренить и выращивать до созревания, как описано в разд. 2.4.3.

Примечания

- ^{а)} Среда MSD4×2 предназначена для регенерации целого ряда видов растений, с которыми работают в Лестере, но не универсальна. Чтобы обеспечить регенерацию побегов, может возникнуть необходимость ис-

- ключения селективных агентов из состава среды. В этом случае трансформированные растения впоследствии можно идентифицировать по способности укореняться в присутствии антибиотиков или с помощью процедур скрининга по экспрессии перенесенного гена (гл. 6).
- б) Важно не субкультивировать трансформированные колонии в слишком большом объеме среды, иначе им трудно будет прижиться.
 - в) Отметим, что до сих пор многие виды не удалось успешно регенерировать из материала, полученного из протопластов.
 - г) Повторный перенос на соответствующие среды для регенерации, температурный шок и другие воздействия могут способствовать регенерации из определенных тканей.

2.10. Трансформация клеток суспензионной культуры моркови

2.10.1. Основные положения

Неудачи в экспериментах по трансформации культурных видов растений, как правило, обусловлены трудностями в их культивировании *in vitro* и не связаны с неадекватностью векторной конструкции. Трансформация протопластов имеет ограниченное применение, поскольку только немногие экономически важные виды можно легко регенерировать из тканей, полученных из протопластов. Однако у многих сельскохозяйственных растений возможна регенерация из каллуса и клеток суспензионной культуры как путем органогенеза [28], так и соматического эмбриогенеза [3]. Поэтому предпринимаются большие усилия по разработке эффективных систем трансформации для этих тотипотентных клеток культурных растений [5, 62, 65].

В настоящем разделе рассматривается трансформация эмбрионных клеток суспензионной культуры моркови с помощью неонкогенного штамма *Agrobacterium* [C58C1(pGV3850::1103)]. На рис. 2.18 схематически изображены основные этапы данного процесса. Подходящей культурой моркови может быть недавно установившаяся, высокоэмбриогенная клеточная суспензия. Когда такие культуры поддерживают в среде, содержащей высокую концентрацию ауксина (обычно 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 2,4-Д), они состоят из небольших колоний проэмбриогенной ткани (рис. 2.19, А), которые по существу представляют собой сложные эксплантаты. После удаления ауксина клетки, из которых состоят эти колонии, с высокой частотой вступают на путь соматического эмбриогенеза с образованием большого числа соматических зародышей (3000 на 1 г ткани), которые могут развиваться с образованием нормальных растений. Для совместного культивирования с агробактериями проэмбриогенные клетки моркови из суспензион-

ной культуры высевают с низкой плотностью (250 клеток на чашку) на фидерный слой суспензионных клеток моркови, поскольку при данной плотности они не способны к росту без посторонней помощи. В этих условиях клетки моркови быстро растут, формируя видимые колонии диаметром 0,1—0,2 мм в течение 7—10 дней. На данной стадии растительную ткань инокулируют *A. tumefaciens* и чашки инкубируют до 7 дней. После совместного культивирования переносные диски помещают на

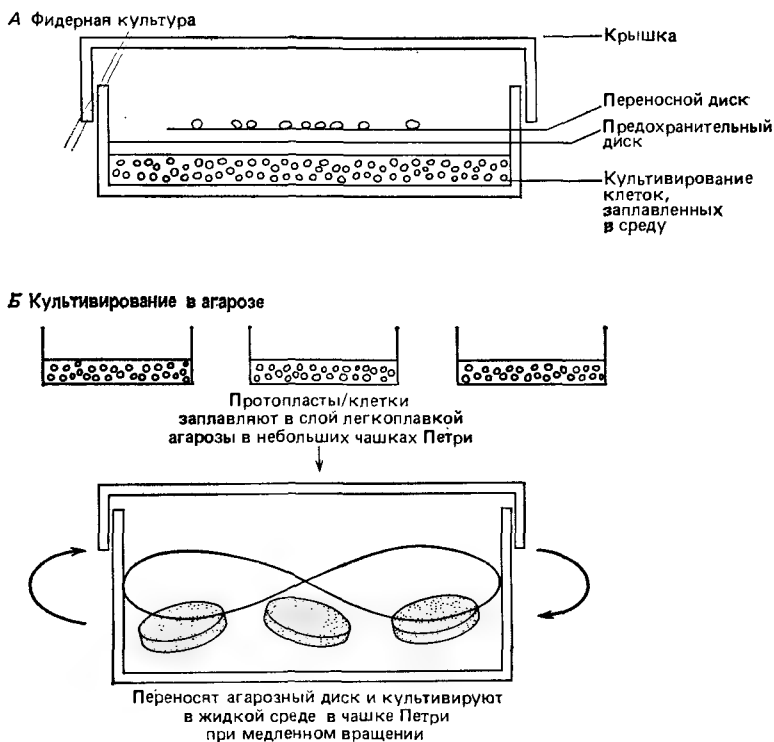


Рис. 2.17. Методы культивирования и селекции трансформированных растительных клеток.

селективную среду, которая содержит антибиотик (обычно цефотаксим) для уничтожения агробактерий. Через 3—4 нед на чашках, инкубированных вместе со штаммом *A. tumefaciens*, содержащим химерный ген устойчивости к антибиотику, например *pos-npt-II*, появляются резистентные колонии (рис. 2.19, Б), тогда как клетки, инкубированные с контрольным штаммом агробактерий, не способны к дальнейшей пролиферации (рис. 2.19, В).

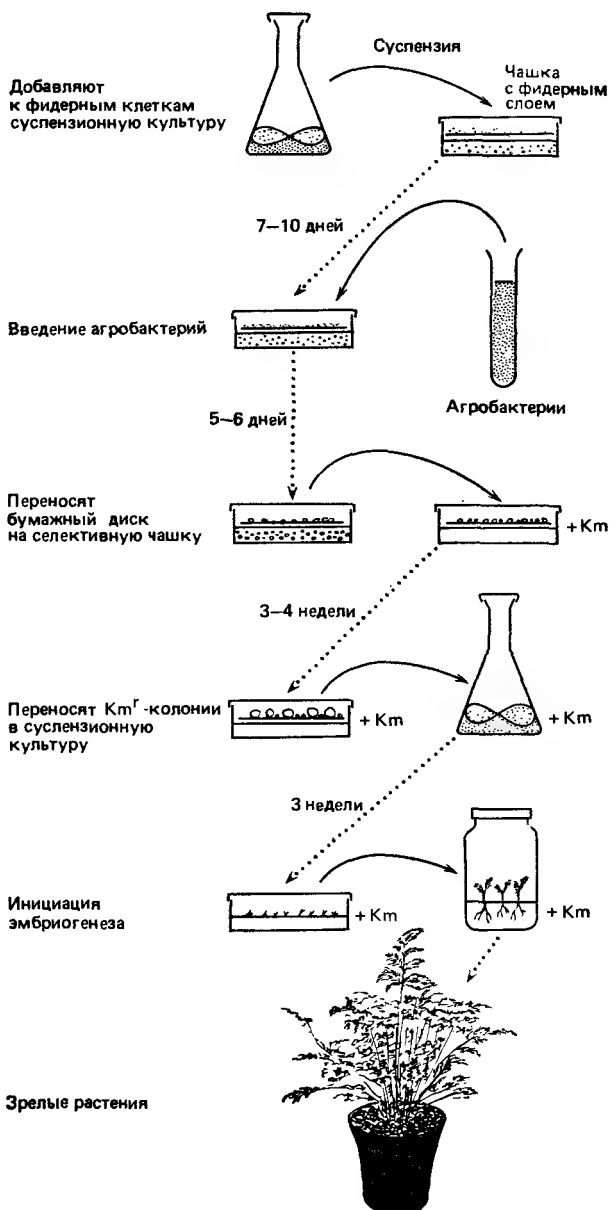


Рис. 2.18. Техника трансформации суспензионных клеток моркови.

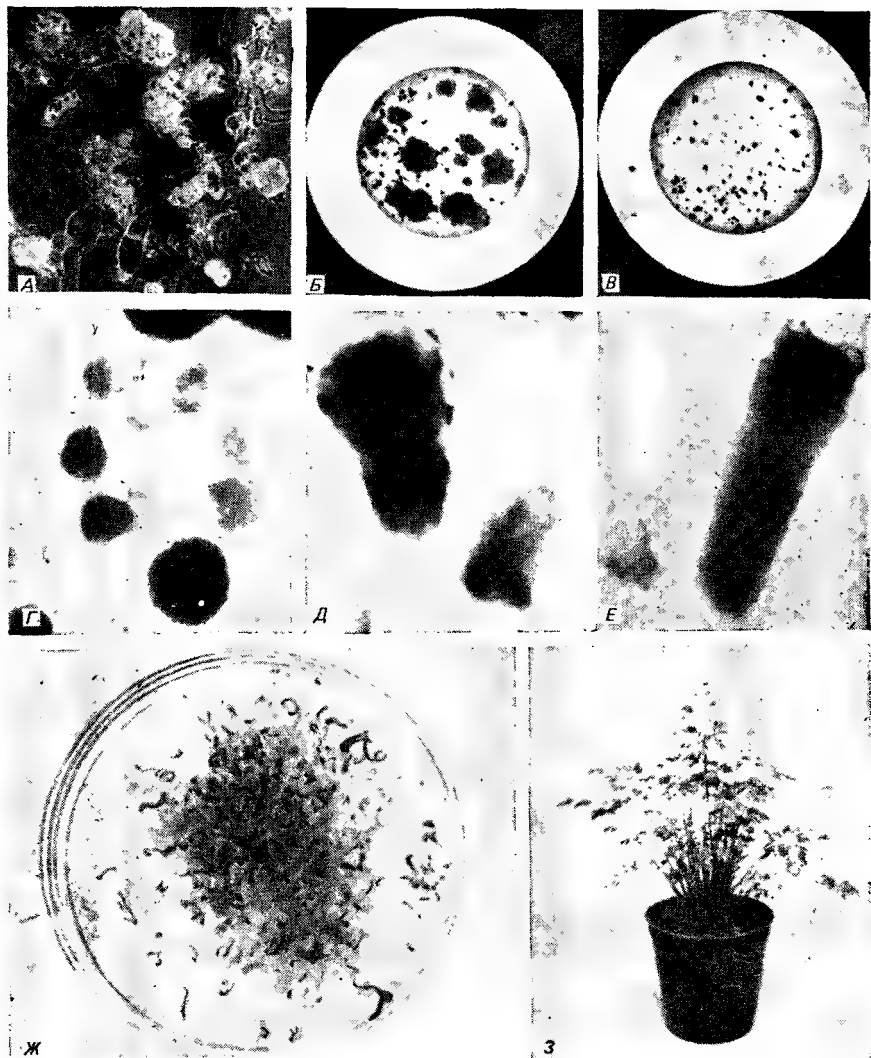


Рис. 2.19. Трансформация клеток суспензионной культуры моркови с помощью агробактерий. А. Прозембриогенные клетки суспензионной культуры, пригодные для совместного культивирования. Б. Селекция резистентных к канамицину колоний после совместного культивирования проэмбриогенной суспензии клеток и штамма *A. tumefaciens* C58C1(pGV3850::1103) и выращивания в течение 2—3 нед на селективной среде (UM+200Сх+100 Km). В. Колонии клеток, полученные, как описано выше (Б), за исключением того, что совместное культивирование осуществляли со штаммом C5831(pGV3850). Г—Ж. Соматический эмбриогенез из суспензии резистентных к канамицину клеток, индуцированных путем переноса на среду MSO, содержащую 100 мкг/мл канамицина. Эмбрионы на глобулярной (Г), сердцевидной (Д), продолговатой (Е) и зрелой (Ж) стадиях роста. З. Трансформированное растение, перенесенное в почву. UM — среда Uchimiya и Murashige.

Для подсчета частоты трансформации можно сначала поместить переносные диски на неселективную УМ-среду (содержащую только цефотаксим) и подождать, пока диаметр растущих микроколоний не составит 2—3 мм. Отдельные колонии затем переносят на селективную среду, помещая по 100 колоний на одну чашку Петри диаметром 9 см, и вычисляют частоту трансформации через 2—3 нед по количеству резистентных колоний. Диапазон частот трансформации для моркови составляет 60—70% [65]. После селекции трансформированный статус резистентных колоний подтверждают путем тестирования экспрессии диагностических маркерных генов. В случае C58C1 (pGV3850 : 1103) резистентные колонии тестируют на активность неомицинфосфотрансферазы (NPT-II) и присутствие нопалина (см. гл. 6). Убедившись в том, что отобранные каллусы действительно трансформированы, их можно использовать для регенерации устойчивых к канамицину растений. Для этого кусочки каллусов переносят в жидкую среду УМ, содержащую канамицин, чтобы снова получить клеточные суспензии. Затем может быть инициирован соматический эмбриогенез путем тщательного отмывания клеток для удаления 2,4-Д и посева на среду без ауксина (рис. 2.19, Г—Ж). Прозембриогенные клетки в суспензии, у которых эмбриогенез обычно супрессирован высокой концентрацией в УМ-среде 2,4-Д, сначала становятся поляризованными путем неравного деления, а затем проходят через нормальные стадии формирования зародыша (глобулярную, рис. 2.19, Г, сердцевидную, рис. 2.19, Д, и продолговатую, рис. 2.19, Е), образуя соматические эмбриониды (рис. 2.19, Ж). Весь процесс занимает около трех недель. Присутствие канамицина в среде не оказывает неблагоприятного влияния на соматический эмбриогенез резистентных к канамицину проэмбрионов моркови, однако в противоположность этому нетрансформированные клетки моркови не способны вступать даже в очень ранние стадии эмбриогенеза на содержащей канамицин среде. Эмбриониды могут развиваться на MS-среде без гормонов, а при достаточно большом размере их можно перенести в почву (рис. 2.19, З).

Ряд особенностей делают данный метод трансформации весьма удобным.

1. Для трансформации не нужно получать протопласты, что, конечно, экономит много времени и усилий.
2. Все полученные до сих пор данные свидетельствуют, что трансформированные колонии имеют клональное происхождение.
3. Частота трансформации относительно высока, поэтому в одном эксперименте можно получить много **независимых** трансформантов.

4. Трансформированные клетки являются эмбриогенными, способными легко регенерировать растения.

Показано, что этот общий метод трансформации применим с небольшими вариациями ко всем клеточным суспензиям двудольных растений, тестированным к настоящему времени.

2.10.2. Инициация проэмбриогенных суспензионных клеточных культур моркови, приготовление фидерных чашек и высев на переносные диски

2.10.2.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычные материалы для культуры тканей (приложение 2[1]).
- Стерильные диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 и 8,5 см (Whatman № 1).
- Камера для подсчета колоний на 1 мл (тип Sedgewick Rafter).
- Инвертированный фазово-контрастный микроскоп Nikon Diaphot (или эквивалентный).
- Семена моркови (например, Sutton Seeds Ltd, New Red Intermediate).
- Суспензия клеток моркови (через 10 дней после субкультивирования).

Растворы

Все ростовые среды для культур растительных клеток (приложение 2[II]).

- Агаризованная (0,8%) среда для проращивания стерильных семян; по 25 мл в чашках Петри диаметром 9 см (например, для моркови используют MSO).
- Агаризованная (0,8%) среда для индукции каллуса; по 25 мл в чашках Петри диаметром 9 см (например, для моркови используют УМ-среду).
- Среда для суспензионной культуры (например, для моркови используют УМ-среду).
- Агаризованная среда для суспензионной культуры (расплавленная и выдерживаемая при 40°C) для приготовления фидерных чашек (например, УМ-среда для моркови).

2.10.2.2. Методика

Инициация проэмбриогенных суспензионных культур моркови

Изложенная ниже методика позволяет получить проэмбриогенную суспензионную культуру из сегментов черешка проростков моркови. Хотя для иницирования суспензионных клеточ-

ных культур других видов растений основные положения методики остаются в силе, выбор эксплантата, сред и условий культивирования должен быть изменен согласно [4]. Следует подчеркнуть, что растения моркови были использованы только как пример для демонстрации трансформации и регенерации путем эмбриогенеза. Данный метод трансформации одинаково эффективен как при использовании суспензионных культур, которые регенерируют путем органогенеза, так и культур, которые не являются тотипотентными.

1. Поверхностно стерилизованные семена (10%-ный Domestos, 20 мин) промывают стерильной водопроводной водой и проращивают на MSO-среде при 25°C под лампами дневного света с белым спектром (16-часовой день, 4000 люкс). Можно проращивать семена и в стерильном вермикулите, смоченном раствором Хогланда (см. разд. 2.5, примечание а).
2. Срезают сегменты черешка (длиной 1 см) из проростков 7-дневного возраста и помещают на UM-среду, содержащую 2 мг/л 2,4-Д, для индукции каллуса. Образование каллуса занимает около 4 нед.
3. Стимулируют эмбриогенные суспензионные культуры путем переноса около 0,2 г каллуса моркови в 25 мл жидкой UM-среды в колбах Эрленмейера (конических) на 100 мл. Инкубируют культуры при 25°C при круглосуточной слабой освещенности (200—500 люкс) на качалке с круговым вращением (120 об/мин).
4. Субкультивируют каждые две недели путем переноса 15 мл культуры в 65 мл UM-среды в колбах Эрленмейера на 250 мл. В конце периода субкультивирования в 1 мл культуральной суспензии содержится приблизительно $1,3 \times 10^6$ высевающихся единиц. Типичная проэмбриогенная суспензионная клеточная культура показана на рис. 2.19, А. Обратите внимание на маленькие, с плотной цитоплазмой, толстостенные клетки, плотно упакованные в проэмбриогенные агрегаты. Неэмбриогенные клетки гораздо больше по размеру и слабее связаны между собой. Суспензионные культуры можно использовать в экспериментах по трансформации через 8—10 нед после инициации.

Приготовление фидерных чашек

1. Выливают 20 мл суспензионной культуры в стерильную пластиковую стандартную пробирку на 25 мл и дают крупным клеточным колониям осесть в течение 5 мин. Небольшие колонии будут осаждаться последними и использоваться для приготовления фидерной чашки.
2. С помощью пастеровской пипетки переносят около 2 мл тонкой суспензии в чашку Петри диаметром 9 см и заливают

15 мл УМ-среды (40°C) из градуированной пластиковой пробирки. Размешивают клеточную суспензию путем покачивания чашки легким круговым движением и дают застыть в течение 15 мин.

3. Помещают на поверхность твердого агара «предохраняющий» диск стерильной фильтровальной бумаги диаметром 8,5 см^а), а поверх него — стерильный диск диаметром 5 см («переносной»). Если диски остались сухими, то их можно смочить небольшим количеством жидкой УМ-среды.
4. Инкубируют фидерные чашки 3—4 дня.

«Засев» переносных дисков

1. Выливают 20 мл клеточной суспензии моркови в стерильную пластиковую пробирку и дают отстояться большим колониям клеток в течение 5 мин.
2. Пастеровской пипеткой переносят супернатант в чистую стандартную пробирку. Для высева на переносной диск будут использоваться маленькие агрегаты клеток и отдельные клетки.
3. С помощью пипетки 1 мл супернатанта вносят в камеру для счета и определяют число клеточных колоний в 1 мл.
4. Доводят концентрацию высеваемых клеток до 500 колониеобразующих единиц на 1 мл, разводя их жидкой УМ-средой или концентрируя путем центрифугирования.
5. С помощью микропипетки Gilson P1000 высевают на каждый переносной диск 250 колониеобразующих единиц, стараясь покрыть максимальную площадь переносного диска.

2.10.3. Инокуляция клеток моркови агробактериями, селекция трансформантов и регенерация путем соматического эмбриогенеза

2.10.3.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычные материалы для культуры тканей (приложение 2[1]).
- Нейлоновые сита (стерильные) с отверстиями 200 и 80 мкм.
- Стерильные универсальные пробирки.
- Ночные культуры (разд. 1.3) штамма агробактерий, несущего неонкогенную Ti-плазмиду с селективным маркерным геном, и контрольного штамма, не несущего маркерного гена (например, C58C1(pGV3850::11030) и C58C1(pGV3850), гл.1).

Растворы

[Культуральные среды для растительных клеток (приложение 2[II]).

- Среда для суспензионной клеточной культуры (например, УМ для моркови).
- Селективные и контрольные чашки; по 25 мл среды на чашку диаметром 9 см. Например:
 $UM + Km$ (100 мкг/мл) + Сх (250 мкг/мл)
 $UM + Сх$ (250 мкг/мл).
- Среда для суспензионных культур с селективным агентом [например, для Km^r -клеток моркови $UM + Km$ (100 мкг/мл)].
- Среда для суспензионных культур, используемая для отмывания трансформированных клеток перед индукцией эмбриогенеза (например, в случае Km^r -трансформированных клеток моркови используют $MSO + 0,5$ мкМ абсцизовой кислоты).
- Агаризованная (0,8%) среда для индукции эмбриогенеза; по 20 мл в чашках Петри диаметром 9 см [для трансформированных клеток моркови используют $MSO + Km$ (100 мкг/мл)].

2.10.3.2. Методика

Инокуляция клеток моркови агробактериями

1. Берут ночные культуры (разд. 1.3) штаммов *Agrobacterium* C58C1(pGV3850::1103) и C58C1(pGV3850) и готовят разведения каждой (1:1000) в жидкой УМ-среде (10 мкл культуры в 10 мл)^{б)}.
2. С помощью микропипетки Gilson P200 в каждую чашку вносят по 200 мкл разведенных агробактерий в виде нескольких капель. Инокулируют по крайней мере три чашки штаммом C58C1(pGV3850) и три чашки — C58C1(pGV3850::1103).
3. Обматывают края чашек лентой Nescofilm и инкубируют в течение 4—8 дней или до появления колоний агробактерий на поверхности фильтровальной бумаги^{в)}.

Селекция трансформантов

1. Помещают переносные диски на селективные/контрольные чашки (с помощью стерилизованного в пламени горелки пинцета) для получения следующих комбинаций^{г)}.
 - а) C58C1(pGV3850) на $UM + Km$ (100 мкг/мл) + Сх (250 мкг/мл)
 - б) C58C1(pGV3850) на $UM + Сх$ (250 мкг/мл)
 - в) C58C1(pGV3850::1103) на $UM + Km$ (100 мкг/мл) + Сх (250 мкг/мл)
 - г) C58C1(pGV3850::1103) на $UM + Сх$ (250 мкг/мл).

2. Обматывают края чашек лентой Nescofilm, инкубируют при 25 °С (2000—4000 люкс) и постоянно наблюдают за ними.
3. Через 15—20 дней на селективных чашках, содержащих клетки, инокулированные C58C1 (pGV3850:1103), должны появиться резистентные к канамицину колонии (рис. 2.19, Б), тогда как колонии, полученные из клеток, инокулированных C58C1 (pGV3850), должны расти только на средах, не содержащих канамицина. Просматривают все чашки и оценивают частоту трансформации.
4. Когда диаметр колоний достигнет 0,5—1,5 см, их можно перенести на свежую селективную среду (UM+Сх+Km) для дальнейшего роста и анализа (гл. 6) и использовать как исходный материал для соматического эмбриогенеза.

Соматический эмбриогенез в присутствии канамицина

1. Наиболее удобно инициировать соматический эмбриогенез в суспензионных культурах, так что необходимо сначала получить их из каллуса, образовавшегося из отдельных трансформированных колоний (разд. 2.10.2.2).
2. Для получения однородной популяции зародышей 40 мл суспензии приблизительно 10-дневного возраста фильтруют через сито с диаметром пор 200 мкм, а затем через сито с диаметром пор 80 мкм.
3. Центрифугируют и объединяют фильтраты в одну стерильную стандартную пробирку. Тщательно промывают суспензию жидкой MSO+0,5 мкМ абсцизовой кислоты (АБК) путем повторного (по крайней мере дважды) центрифугирования и ресуспендирования^а.
4. Ресуспендируют фильтрат в конечном объеме 10 мл MSO+АБК и высевают на поверхность 20 мл агаризованной MSO среды в чашке Петри диаметром 9 см.
5. Обматывают края чашки и инкубируют в темноте при 25 °С. Эмбрионы должны появиться в течение 10 дней и достичь нормального размера через 2—3 нед (рис. 2.19, Г—Ж).
6. Для прорастания зародыши необходимо поместить на твердую среду MSO без АБК и выдерживать на свету; через 15 дней из них разовьются растеньица.
7. Для дальнейшего роста растеньица можно перенести непосредственно в компост (например, Levingtons), если выдерживать их во влажной среде 3—5 дней (рис. 2.19, З). Следует избегать излишней сырости, поскольку растеньица склонны к «выпреванию»^е.

Примечания

^а Кружки фильтровальной бумаги Whatman диаметром 9 см слишком велики для чашек Петри того же диаметра!

- б) Число агробактерий, используемых для инокуляции, должно составлять около 1000 бактерий на чашку. Поскольку различные штаммы агробактерий растут с различной скоростью, важно перед началом экспериментов определить концентрацию бактерий в ночной (12-часовой) культуре, используемой для инокуляции. Это можно сделать путем выращивания бактерий в стандартных условиях и высевая на чашки с твердой агаризованной питательной средой определенные разведения культуры (10^{-3} — 10^{-4}). Соответствующие коэффициенты разведений можно затем определить по числу появившихся колоний, чтобы получить приблизительно 1000 бактерий в 200 мкл разведенной суспензии.
- в) Различные штаммы агробактерий различаются по скорости роста на засеянных переносных дисках, так что невозможно назвать определенное время инкубации для этапа совместного культивирования. Поэтому для оптимизации данного этапа необходимо проделать некоторую предварительную работу. Совместное культивирование должно продолжаться как минимум 5 дней и, если возможно, до 10 дней. В конце периода совместного культивирования бактерии должны быть видны на поверхности переносного диска в виде отдельных колоний. Нельзя допускать, чтобы отдельные колонии бактерий слились в сплошной газон, поскольку в этом случае растительные клетки не восстановятся при переносе на селективные чашки. Необходимо найти равновесие между длительностью периода совместного культивирования и снижением жизнеспособности растительных клеток, которое этим вызывается.
- г) а) — это контроль селекции, подтверждающий, что колонии, полученные из клеток, инокулированных C58C1 (pGV3850), не растут на среде с каминацином в данных условиях; б) и г) — это контроли выживаемости, чтобы проверить, что обработка агробактериями и цефотаксимом не вызывает гибели высеваемых клеток, а в) — селективная чашка для трансформированных (Km^r) колоний.
- д) Это важно, поскольку UM-среда содержит в высокой концентрации 2,4-Д, который оказывает сильное ингибирующее влияние на эмбриогенез. АБК способствует нормальному течению эмбриогенеза и ингибирует преждевременное созревание, в частности растяжение корня.
- е) Общие указания по укоренению культивируемых растений в компосте см. в разд. 2.4.3.

Приложение 2 [I]

Обычные материалы для работы с культурой тканей

А. Общее оборудование

- Скальпель (с длинной и короткой ручкой).
- Шпатель (длинный).
- Пинцет (длинный и средний).
- Часовой пинцет.
- Ламинар (John Bass Ltd. или Slee Medical Ltd.).
- Горелка Бунзена и спички.
- Найлоновые мешки для автоклавирования.
- Одноразовая маска для лица.
- Nescofilm (Sigma).
- Небольшой пластиковый сосуд для мытья посуды.
- Проволочный штатив для стандартных пробирок.

- Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл.
- Резиновые груши для пастеровских пипеток.
- Стакан на 500 мл для отходов.

Б. Стерильное оборудование

- Белые кафельные плитки.
- Пастеровские пипетки.
- Пластиковые чашки Петри диаметром 5, 9 и 14 см (Sterilin Ltd.).
- Пластиковые стандартные пробирки (Sterilin Ltd.).
- Контейнеры для выращивания растений Phytocon (Flow Laboratories Ltd.).
- Конические колбы Эрленмейера из пирекса на 100 и 250 мл.
- Алюминиевая фольга.
- Сосуды на 200 мл.

В. Растворы

- Этиловый спирт.
- Domestos (Lever Brothers Ltd. или раствор аналогичного отбеливателя).
- Стерильная водопроводная вода (350 мл во флаконе на 500 мл).

Приложение 2 [II]

Среда для культуры растительных клеток и тканей

А. Среда на основе солей MS [53]

MSO

(Получение проростков, укоренение побегов, культивирование опухолей и соматический эмбриогенез моркови.)

Компоненты	Концентрация (мг/л)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,000
NH_4NO_3	1650,000
KNO_3	1900,000
KI	0,830
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
KH_2PO_4	170,000
H_3BO_3	6,200
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,000
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,600

Продолжение таблицы

Компоненты	Концентрация (мг/л)
FeSO ₄	27,850
Na ₂ ЭДТА	37,250
Глицин	2,000
Инозитол	100,000
Никотиновая кислота	0,500
Пиридоксин-HCl	0,500
Тиамин-HCl	0,100
Сахароза	30 000,000

Доводят pH до 5,8 0,1 М раствором HCl. Все компоненты, за исключением сахарозы, поставляются в расфасованном виде фирмой Flow Laboratories Ltd.

RD (от англ. root disk medium)

(Поддержание срезов запасующих органов.)

Состав аналогичен MSO, только концентрация солей в два раза ниже; среда не содержит сахарозы и содержит антибиотики: рифампицин (20 мкг/мл), карбенициллин (250 мкг/мл) и фунгицид нистатин (6 мкг/мл).

MSO 1C

(Культивирование опухолей, индуцированных штаммами *A. tumefaciens* дикого типа.)

Добавляют карбенициллин (1 мг/мл) к расплавленной MSO при 45 °C.

MSP1

(Культивирование недифференцированного каллуса *N. tabacum*.)

Эта среда идентична MSO, но содержит следующие добавки:

НУК (нафтилуксусная кислота) 2,0 мг/л

6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,5 мг/л

Приготовление исходных растворов:

НУК: Растворяют 500 мг НУК в 20 мл 50%-ного этанола. Добавляют 80 мкл к 1 л MSO.

6-БАП: Растворяют 126 мг 6-БАП в 1,0 мл 1М HCl, добавляют 99 мл дистиллированной воды и стерилизуют фильтрованием.

Добавляют 400 мкл к 1 л MSO.

MSP1 9M, 7M, 3M

(Культивирование протопластов *N. tabacum*.)

Добавляют маннитол в требуемом количестве — 9%, 7% или

3% (вес на объем) — к MSP1 перед доведением ее до конечного объема:

MSP1 9M — 90 г/л; MSP1 7M — 70 г/л; MSP1 3M — 30 г/л.

MSK

(Размножение пазушных почек *N. tabacum*.)

Состав аналогичен MSO, но дополнительно среда содержит кинетин (0,2 мг/л).

UM (от англ. *Uchimiya* и *Murashige*)

(Культивирование клеток моркови и *Petunia* сорта Blue Lace в суспензионной культуре.)

Соли MSO со следующими добавками:

Пиридоксин	9,50 мг/л
Тиамин	9,90 мг/л
Никотиновая кислота	4,50 мг/л
Кинетин	0,25 мг/л
2,4-Д	2,00 мг/л
Гидролизат казеина	2000,00 мг/л
Сахароза	30 000,00 мг/л, pH 5,8

MSD4×2

(Регенерация побегов у *Petunia*, табака и льна.)

Соли MSO со следующими добавками:

НУК	0,1 мг/л
6-БАП	1,0 мг/л
Сахароза	30 000,0 мг/л, pH 5,8

MSIK

(Общая регенерация побегов.)

Соли MSO со следующими добавками:

ИУК	8,00 мг/л
Кинетин (Sigma)	2,56 мг/л

MS FLAX

(Размножение пазушных почек льна.) Солевой раствор MSO с добавлением кинетина (Sigma) — 0,05 мг/л.

Все приведенные выше среды на основе MSO могут быть агаризованы путем добавления 0,8% агара (8 г/л). Агар, как правило, растворяют, обрабатывая среду перед автоклавированием текучим паром.

Б. Среда Кабоше [16]

(Рост клеток при низких плотностях.)

В эту среду перед использованием необходимо добавить глутамин в концентрации 2 мМ. Глутамин можно растворить в

дистиллированной воде (23,36 мг/мл), стерилизовать фильтрованием и хранить при 20 °С до использования. Добавляют 1,2 мл к 99,8 мл жидкой или расплавленной агаризованной среды, охлажденной до 45 °С. Для приготовления исходного раствора пиридоксина его растворяют в концентрации 5 мг/мл в дистиллированной воде и добавляют в среду в концентрации 100 мкл/л. При необходимости агар добавляют в концентрации 8 г/л.

Стократный исходный раствор	Компоненты	Навеска/100 мл исходного раствора (100×)	Концентрация (мг/л)
100×СА раствор 1	NH_4NO_3	4,00 г	400,000
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,93 г	293,000
100×СА раствор 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,46 г	246,000
100×СА раствор 3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,27 г	27,000
	$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	0,37 г	37,000
100×СА раствор 4	KH_2PO_4	0,68 г	68,000
100×СА раствор 5	H_3BO_3	62,00 мг	6,200
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,70 мг	0,170
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,80 мг	0,280
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 мг	0,025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25 мг	0,025
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,24 мг	0,024
<i>Компоненты, добавляемые непосредственно в конечный раствор</i>			
	Инозитол		180,000
	Пиридоксин		0,500
	НУК		0,100
	6-БАП		1,000
	Сахароза		20 000,000
	pH 5,6		

В. Среда В5 [31]

Компоненты	Концентрация (мг/л)
<i>Макродобавки</i>	
KNO_3	3 000,000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500,000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,000
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150,000
Секвестрен 330 Fe	28,000
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,000
<i>Микродобавки</i>	
KI	0,750
H_3BO_3	3,000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,000
CuSO_4	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250

Продолжение таблицы

Компоненты	Концентрация (мг/л)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Миоинозитол	100,000
Тиамин-HCl	10,000
Никотиновая кислота	1,000
Пиридоксин-HCl	1,000
Сахароза	20 000,000
pH 5,5	

Перечисленные выше компоненты, за исключением сахарозы, поставляются готовыми к употреблению фирмой Flow Laboratories Ltd.

Г. Раствор Хогланда

Исходный раствор	Компоненты	Концентрация (г/л)	Объем исходного раствора на литр конечной среды (мл)
	<i>Макродобавки</i>		
A	KNO ₃	101,100	6,0
B	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,160	4,0
C	NH ₄ H ₂ PO ₄	115,080	2,0
D	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,490	1,0
	<i>Микродобавки</i>		
	KCl	3,728	1,0
	H ₃ BO ₃	1,546	1,0
E	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,338	1,0
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,575	1,0
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,125	1,0
	H ₂ MoO ₄	0,081	1,0
F	Fe ЭДТА	6,922	1,0

Исходные растворы А — F готовят отдельно и хранят в течение нескольких недель при 4°C или более длительное время в замороженном виде при -20°C.

Приложение 2 [III]

Антибиотики, добавляемые в среды для культур растительных клеток

— Карбенициллин (Cb) (Sigma): растворяют в концентрации 100 мг/мл в дистиллированной H₂O и стерилизуют фильтрованием. Хранят до 1 мес при 4°C или в замороженном виде (-20°C).

- *Цефотаксим* (Сх) (Rousell Laboratories Ltd.): растворяют в дистиллированной H_2O в концентрации 50 мг/мл и стерилизуют фильтрованием. Хранят при $-20^\circ C$. Содержащийся в культуральной среде цефотаксим разрушается на свету приблизительно через 3 дня.
 - *Канамицин* (Km) (Sigma): растворяют в концентрации 10 мг/мл в дистиллированной H_2O и стерилизуют фильтрованием. Хранят до 1 мес при $4^\circ C$ или в замороженном виде ($-20^\circ C$).
 - *Рифампицин* (Pf) (Sigma): растворяют в метаноле в концентрации 20 мг/мл. Помещают навеску рифампицина в стерильную стандартную пробирку, добавляют метанол, закрывают пробирку и встряхивают. Хранят до 3 мес при $-20^\circ C$.
 - *Тетрациклин* (Tc) (Sigma): Растворяют в концентрации 10 мг/мл в дистиллированной H_2O и стерилизуют фильтрованием. Хранят до 1 мес при $4^\circ C$ или в замороженном виде ($-20^\circ C$).
 - *Гигромицин* (Hm) (Sigma): растворяют и хранят так же, как канамицин.
 - *Нистатин* (Ny) (Sigma): растворяют в метаноле в концентрации 10 мг/мл непосредственно перед использованием, т. к. нистатин нестабилен при хранении исходных растворов.
- Все антибиотики можно добавлять непосредственно в жидкую среду перед использованием или в расплавленную агаризованную среду, охлажденную до $45-55^\circ C$.*

Приложение 2 [IV]

Подготовка эксплантатов для инокуляции агробактериями

А. Эксплантаты стерильных проростков

1. Стерилизуют поверхность семян в 10%-ном (вес на объем) растворе коммерческого отбеливателя (гипохлорита натрия) при конечной концентрации активного хлора около 1%. Время стерилизации зависит от вида растения, но обычно составляет 10—30 мин. Если у семян плотная восковая оболочка или сильно опушенная и неровная поверхность, стерилизация достигается их предварительным ополаскиванием в 70%-ном этаноле в течение 5—10 с.
2. Промывают семена 5 раз стерильной водопроводной водой. Если семена очень маленькие, то удобно стерилизовать и отмывать их в стерильной нейлоновой сетке либо в нейлоновом или стальном нержавеющей сите (например, чайном ситечке).
3. Проращивают семена на MSO-среде (приложение 2[II]), содержащей 0,8% агара, в подходящем культуральном сосуде.

Инкубируют при 25°C (4000 люкс) и подращивают проростки до необходимого размера. Можно прорастить стерилизованные семена и в вермикулите, смоченном раствором Хоглаида (приложение 2[II]).

4. Для получения требуемых эксплантатов растения нарезают на стерильной белой керамической плитке.

Б. Эксплантаты тепличных растений

1. Тщательно моют щеткой запасующие органы, срезают молодые побеги, листья или ткани цветка у выращенных в теплице растений и стерилизуют их поверхность 10%-ным коммерческим отбеливателем (вес на объем) в течение 20—30 мин. Крупные эксплантаты удобно стерилизовать в больших плоских сосудах из пирекса; небольшие эксплантаты — в меньших стерильных сосудах или стандартных пробирках.
2. Ополаскивают ткани в 5 сменах стерильной водопроводной воды.
3. Используя стерильную белую кафельную плитку или большую чашку Петри, удаляют все поврежденные отбеливателем участки растений с помощью стерильного скальпеля, как описано ниже.

Большие эксплантаты

1. Побеги: срезают крупные базальные листья и разрезают на кусочки длиной 4 см (или более, если кусочек помещается в сосуде для культивирования). Длинные отрезки черешков можно получить аналогичным способом.
2. Запасующие органы: нарезают на части удобного размера и затем вырезают диски толщиной 0,3—0,5 см и диаметром 1—2 см.
3. Помещают диски на RS-среду (25 мл в чашке Петри диаметром 9 см) и втыкают побеги основанием вниз в твердую агаризованную среду MSO (состав сред см. в приложении 2[II]).

Небольшие эксплантаты

Листовые диски, небольшие срезы тканей цветка, стебля или черешки следует готовить осторожно, стараясь не смять, и как можно быстрее помещать в соответствующую жидкую среду (как правило, MSD4×2), чтобы избежать высыхания. Размер эксплантатов может варьировать в диапазоне 2—10 мм².

В. Эксплантаты размножаемых растений

Размножение растений — это удобный путь получения однородных партий стерильных, генетически идентичных культур и

побегов для экспериментов по трансформации. Получение растительного материала путем размножения *in vitro* имеет то преимущество, что для этого не требуется теплица. Кроме того, растения избегают контакта с насекомыми и микроскопическими вредителями. Однако данная методика требует больших усилий, чем проращивание стерильных семян *in vitro* или стерилизация эксплантатов из выращенных в теплице побегов. Размножаемые *in vitro* растения очень редко цветут и их нельзя считать физиологически нормальными. Технология размножения *in vitro* зависит от конкретного вида растения, более подробные сведения можно найти в литературе [19, 42, 43].

В большинстве методов для размножения двудольных растений используют эксплантаты пазушных почек. Методика размножения в случае табака и льна изложена соответственно в разд. 2.4.3 и 2.5.3.2. Эксплантаты из размножаемых *in vitro* растений можно получить, как описано выше, для побегов в разд. А и Б.

Приложение 2 [V]

Растворы для выделения протопластов табака

А. CPW соли

Компонент	Исходный раствор (×100) (мг/л)	Концентрация (мг/л)
<i>Раствор 1</i>		
KH_2PO_4	2 720,00	27,200
KNO_3	10 100,00	101,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	24 600,00	246,000
KI	16,00	0,160
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,50	0,025
<i>Раствор 2</i>		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	148 000,00	1 480,000

Исходные растворы можно хранить при 4 °С несколько месяцев.

CPW 13M: соли CPW с добавлением 13% (вес на объем) маннитола (130 г/л).

CPW 9M: соли CPW с добавлением 9% (вес на объем) маннитола (90 г/л).

CPW 21S: соли CPW с добавлением 21% (вес на объем) сахарозы (210 г/л).

Доводят pH среды до 5,8 и стерилизуют автоклавированием.

Б. Растворы ферментов для выделения из листьев мезофильных протопластов табака

Целлюлаза «Опозука» R10 0,2% (вес на объем)

Мацерозим R10 0,5% (вес на объем)

Эти ферменты можно приобрести через фирму R. W. Unwin Ltd.

Растворяют оба фермента в CPW 13M, стерилизуют фильтрованием через мембрану с размером пор 0,45 мкм и затем хранят при -20°C .

Приложение 2 [VI]

Выделение протопластов из измельченных кусочков листа

1. Стерилизуют поверхность листьев тепличных растений табака или срезают листья с размножаемых *in vitro* растений. Стараются использовать молодые листья, которые вот-вот полностью распустятся.
2. Помещают один лист на стерильную белую кафельную плитку и с помощью скальпеля удаляют среднюю и боковые жилки. Складывают полоски листовых пластинок в удобные стопки и нарезают как можно мельче.
3. Равномерно распределяют измельченные листья по двум чашкам Петри (диаметр 9 см), содержащим 20 мл среды CPW 13M (приложение 2 [V]). Стараются, чтобы материал был хорошо увлажнен.
4. С помощью стерильного шприца на 60 мл отбирают среду и заменяют ее на 10 мл смеси ферментов (0,2% целлюлазы + 0,1% мацерозима в CPW 13M).
5. Инкубируют в течение ночи при 25°C в темноте.
6. Осторожно встряхивают переваренные кусочки листа в смеси ферментов для высвобождения протопластов и переносят содержимое чашки в другую, аналогичную первой. При этом суспензию пропускают через сито с размером пор 64 мкм, чтобы удалить крупные агрегаты дебриса.
7. С помощью пастеровской пипетки переносят суспензию протопластов в две центрифужные пробирки Sarstedt с закручивающимися крышками, центрифугируют 10 мин при 400 об/мин в центрифуге MSE Centaur 2 (или эквивалентной) и затем обрабатывают протопласты, как описано в разд. 2.7.3, стадии 8—12).

Приложение 2 [VII]

Методы флуоресцентного окрашивания для контроля развития растительных протопластов

А. Визуализация регенерации клеточной стенки с помощью тинопала

1. Готовят насыщенный раствор тинопала (Tinopal, Ciba Geigy) в дистиллированной воде. Хранят в темноте при 4°C.
2. Не взбалтывая нерастворившийся материал, добавляют 0,1 мл насыщенного раствора тинопала к 20 мл CPW 9M (приложение 2 [V]) и перемешивают. Этот раствор можно стерилизовать фильтрованием и хранить в холодильнике в течение нескольких месяцев.
3. Смешивают одну каплю тинопала в среде CPW 9M с одной каплей суспензии протопластов на чистом предметном стекле и накрывают покровным стеклом, затем оставляют на 5 мин при комнатной температуре.
4. Препарат исследуют под микроскопом, снабженным флуоресцентной приставкой с фильтром для возбуждения в области 330—380 нм.

Б. Визуализация ядер с помощью акридинового оранжевого

1. Готовят краситель акридиновый оранжевый, растворяя 10 мг акридинового оранжевого (Sigma) в 4 мл 50 мМ глицин-NaOH буфера, pH 8,5 и смешивают с 6 мл CPW 13M. Хранят в темноте при 4°C.
2. Добавляют одну каплю раствора акридинового оранжевого к 3 мл суспензии протопластов и инкубируют в темноте 15 мин при комнатной температуре.
3. Для уменьшения фона отмывают протопласты центрифугированием при 100 g в течение 5 мин и ресуспендируют осадок в среде CPW 9M. Повторяют дважды.
4. Наблюдают с помощью УФ-микроскопа, как описано выше в разд. А, используя голубой фильтр возбуждения флуоресценции.

В. Определение выживаемости клеток с помощью диацетата флуоресцеина

1. Готовят исходный раствор диацетата флуоресцеина (Sigma) в ацетоне в концентрации 5 мг/мл. Хранят при -20°C.
2. Готовят 0,01%-ный раствор диацетата флуоресцеина в MSP1 9M (приложение 2 [II]).
3. Осаждают клетки или протопласты и ресуспендируют в растворе красителя. Оставляют на 5 мин при комнатной температуре, а затем наблюдают с помощью УФ-микроскопа, используя голубой фильтр.

Приложение 2 [VIII]

Примеры процедур генетической трансформации растений, основанных на системе переноса генов агробактерий

Виды (Число сортов)	Эксплантат ¹⁾	Vir-помощник и вектор	Маркерный ген	Метод регенерации побегов и ком- ментарии
Виды <i>Solanaceous</i> <i>Nicotiana tabacum</i> ²⁾ (2)	Листовые диски (Т). Фидерная культура	pTiB6S3SE::pMON200	Km	Прямая регенерация — (1—20)/эксплантат. Укоренение на Km. Довольно много нетрансформированных побегов, устойчивых к антибиоту (50%).
<i>Nicotiana tabacum</i> ³⁾ (4)	Стебель и листовые диски (С)	pTiBo542/pGA472	Km	Органогенез только из небольшого числа Km ^r -каллусов. Регенерация возможна только из Km ^r -клеток, которые не содержат онкогенной Т-ДНК.
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁴⁾ (1)	Стебель (С)	pRiA4	KK	Органогенез из косматых корней. У всех растений аномальный фенотип, характерный для таких регенерантов.
<i>Petunia hybrida</i> ^{2), 5)} (1)	Листовые диски (Т) Фидерная культура	pTiB6S3SE::pMON200	Km EPSPS	Прямая регенерация — (1—5)/эксплантат. Укоренение на Km. Довольно много нетрансформированных побегов, устойчивых к антибиоту (50%).
<i>Lycopersicon esculentum</i> ²⁾ (1)	Листовые диски (Т). Фидерная культура	pTiB6S3SE::pMON200	Km	Прямая регенерация — не из всех эксплантатов.

				укоренение на Км. Довольно много нетрансформированных побегов, устойчивых к антибиотику (50%).
<i>Lycopersicon esculentum</i>⁶⁾ (8)	Листовые диски (Т) (гипокотили и семядоли). Фидерная культура	pTiB6S3SE::pMON200 (и аналогичные плазмиды)	Км	Прямая регенерация — (1—8) побегов из 20% эксплантатов. Довольно низкий уровень ложных трансформантов (8%) после укоренения на Км. У 90% нормальная морфология.
<i>Lycopersicon esculentum</i>⁷⁾ (1)	Стебель (С)	pGV3850::pGV1103	Км	Органоогенез из 12% Км⁺-каллусов. Измененный уровень плоидности у 60% растений. Мало нетрансформированных побегов, устойчивых к антибиотику; нет проблем с фертильностью.
<i>Lycopersicon esculentum</i>⁸⁾ (3)	Семядоли (С) (перевернутые или уколотые)	pRiA4/pARC8	Км	Органоогенез из каллуса, полученного из косматого корня. У Км⁺-растений наблюдаются два фенотипа: 1) аномальная морфология, типичная для регенерантов из косматых корней⁹⁾; 2) в основном нормальные побеги возникают из косматых корней, полученных при инокуляции семядолей уколом, а не при инокуляции обрезанных краев эксплантатов.

<i>Lycopersicon esculentum</i> ⁸⁾ (3)	Семядоли (С)	pAL4404/pARC8	Кт	Органогеиез из Кт ^г -каллузов.
<i>Solanum tuberosum</i> (1)	Каллус, образующийся на листовых дисках	pAL4404/pARC8	Кт	Органогеиез из Кт ^г — каллузов, 2—3 Кт ^г -каллуса/эксплантат. Не сообщалось о нетрансформированных растениях, устойчивых к антибиотик у или аномальных растениях.
<i>Solanum tuberosum</i> (2)	Эксплантаты листа и стебля (С)	pTiBo542/pGA472	Кт	Органогеиез с низкой частотой, в основном из Кт ^г -каллузов, полученных из эксплантатов листа. Способны регенерировать клетки, содержащие только неонкогениую Т-ДНК.
<i>Solanum tuberosum</i> ¹¹⁾ (7)	Срезы стебля (Т)	pRi1855	КК	Органогеиез из каллузов, полученных из косматых корней. Все растения проявляют типичный аномальный фенотип регенерантов из косматых корней ⁹⁾ .
Другие семейства <i>Convolvulus arvensis</i> ⁴⁾ (1)	Срезы стебля (Т)	pRiA4	КК	Органогеиез из косматых корней. У всех растений наблюдается типич-

				У всех растений наблюдается типичный аномальный фенотип регенерантов из косматых корней.
<i>Daucus carota</i> ¹²⁾ (1)	Эмбриогенные суспензионные культуры	pGV3850::pGV1103	Km	Невысокие разведения агробактерий, совместно культивируемых в течение 5—8 дней с клетками в низкой концентрации на фидерном слое. 60—70% каллусов были Km ^r , и все они регенерировали в нормальные растения путем соматического эмбриогенеза.
<i>Populus alba</i> × <i>grandidentata</i> ¹³⁾ (1)	Срезы листа (P)	pTiC58/pPMG85/587	Km	Прямое образование побегов — около четырех Km ^r -побегов на 35% эксплантатов. Два типа побегов: 1) аномальные тератомы с онкогенной Т-ДНК и Т-ДНК бинарного вектора, 2) нормальные побеги с Т-ДНК только бинарного вектора. Регенерация была значительно лучше, чем на неинокулированных контрольных эксплантатах листа, возможно благодаря транс-зеатину, секретирiusмому штаммами, несущими pTiC58.

<i>Medicago varia</i> ¹⁴⁾	Срезы стебля (Р)	pTiBo542/pGA471	Кт	Кт⁺-каллусы, развивающиеся на концах всех эксплантатов. Растения, регенерировавшие с низкой частотой путем соматического эмбриогенеза после нескольких субкультивирований. Используемый <i>vir</i>-помощник онкогенный, но регенерировать будут только неонкогенно трансформированные клетки, содержащие Т-ДНК лишь бинарного вектора.
<i>Medicago sativa</i> ¹⁵⁾ (1)	Срезы стебля (Т)	pAL4404/pAPC8	Кт	Кт⁺-каллусы развивались на 20% эксплантатов. Растения развивались путем эмбриогенеза приблизительно из 80% каллусов. Все растения были фенотипически нормальны и фертильны.
<i>Medicago sativa</i> ¹⁶⁾ (1)	Срезы стебля (Т)	pRiA4/pARC4	КК	На большинстве эксплантатов развивались косматые корни через 2—3 нед. Растения регенерировали путем эмбриогенеза из каллуса, полученного из косматого корня, через

<i>Lotus corniculatus</i> ^{17), 18)} (1)	Проростки (С)	pRi15834	KK	Растения развивались из культур косматого корня как путем органогенеза, так и путем соматического эмбриогенеза. У всех растений наблюдаются аномалии, типичные для Ri-регенерантов ⁹⁾ .
<i>Trifolium repens</i> ¹⁹⁾ (1)	Сегменты междоузлий столона (Т)	pAL4404/pBin19 и другие векторы	Km	Трансформированные каллусы отбирали через 3 нед на 30—40% эксплантатов. Регенерация побегов происходила через 4—5 мес после селекции Km ^r -каллусов и последующего переиоса на среду для регенерации.
<i>Cucumis sativus</i> ²⁰⁾ (1)	Гипокотили (С)	pRiA4/pARC8	Km	Зародыши развивались непосредственно на поверхности приблизительно 20% Km ^r -корней. У 20% растений обнаружена только Т-ДНК бинарного вектора и не обнаружена онкогениная Т-ДНК Ri-плазмиды. Некоторые проблемы фертильности, связанные с культивированием <i>in vitro</i> и техникой регенерации.

<i>Brassica napus</i> ²¹⁾ (1)	Стебли нитактных проростков (С)	pRi1855	КК	Из каллуса, полученного на основе одной линии косматого корня, развилось только два побега — у обоих растений наблюдались аномалии, типичные для трансформированных Ri-плазмидой растений ⁹⁾ , оба стерильны.
<i>Brassica napus</i> ²²⁾ (1)	Стебель (Т)	pRiA4	КК	У 50% эксплантатов возникали косматые корни. За формированием почек на всех корнях через 3 нед инкубации в жидкой среде следовал перенос на твердую среду для регенерации в течение еще 2—4 нед. Трансформированные растения отличались аномальными свойствами, типичными для регенерантов косматого корня, и почти нормальным уровнем фертильности.
<i>Arabidopsis thaliana</i> ²³⁾ (1)	Лист (С)	pMON404	Нм	На 50—60% эксплантатов формировались стабильные резистентные к гигромицину каллусы после 2—3 субкультивирований. Побеги формировались приблизительно на 50% каллусов через 4—8 нед.

Виды (Число сортов)	Эксплантат ¹⁾	Vir-помощник и вектор	Маркерный ген	Метод регенерации пробегов и ком- ментарии
<i>Arabidopsis thaliana</i> ²⁵⁾ (1)	Лист (С)	pTi3850/pAK1003	G418	Трансформацию стимулировали ацетосирингоном, чтобы получить G418 ^r -кallусы на 50—60% эксплантатов. 50—60% G418 ^r -кallусов формировали побеги через 6 нед на среде для регенерации.
<i>Gossypium hirsutum</i> ²⁶⁾ (1)	Гипокотили (С)	pAL4404/pCMC1204	Km	Растения регенерировали путем соматического эмбриогенеза.
<i>Linum usitatissimum</i> ²⁷⁾ (2)	Гипокотили (С)	pGV3850::p1103	Km	Растения регенерировали через стадию кallуса.

¹⁾ Эксплантаты: Т — выращенный в теплице материал, С — стерильные проростки, Р — размножаемые растения. КК — селекция клонов трансформированных клеток путем роста косматых корней; ²⁾ [40]; ³⁾ [7]; ⁴⁾ [77]; ⁵⁾ [66]; ⁶⁾ [49]; ⁷⁾ [17]; ⁸⁾ [69]; ⁹⁾ Аномальный фенотип растений, регенерированных из косматых корней: складчатые листья, часто карликовые, низкая фертильность, плагнотропный рост корня [77]; ¹⁰⁾ [67]; ¹¹⁾ [57]; ¹²⁾ [65]; ¹³⁾ [27]; ¹⁴⁾ [21]; ¹⁵⁾ [68]; ¹⁶⁾ [76]; ¹⁷⁾ [46]; ¹⁸⁾ [61]; ¹⁹⁾ [81]; ²⁰⁾ [78]; ²¹⁾ [55]; ²²⁾ [33]; ²³⁾ [48]; ²⁴⁾ [85]; ²⁵⁾ [71]; ²⁶⁾ [79]; ²⁷⁾ [101]; EPSPS — 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate.

Литература

1. Aerts M., Jacobs M., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M., Schell J. (1979) Induction and *in vitro* culture of *Arabidopsis thaliana* crown gall tumours. *Plant Sci. Lett.* 17, 43—50.
2. Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5994—8.
3. Ammirato P. V. (1983) Embryogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1, pp. 82—123. Eds. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y. Macmillan, New York.
4. Ammirato P. V., Evans D. A., Sharp W. R., Yamada Y. (1984) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3. Macmillan, New York.
5. An G. (1985) High efficiency transformation of culture tobacco cells. *Plant Physiol.* 79, 568—70.
6. An G. (1986) Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol.* 81, 86—91.
7. An G., Watson B. D., Chiang C. C. (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato, and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol.* 81, 301—5.
8. André D., Colau D., Schell J., Van Montagu M., Hernalsteens J. (1986) Gene tagging in plants by a T-DNA insertion mutagen that generates APH(3')II-plant gene fusions. *Mol. Gen. Genet.* 204, 512—18.
9. Ashby A. M., Watson M. D., Shaw C. H. (1987) A Ti-plasmid determined function is responsible for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards the plant wound product acetosyringone. *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 189—92.
10. Basiran N., Armitage P., Scott R. J., Draper J. (1987) Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens*. Regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell Rpts.* 6, 396—9.
11. Bevan M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12, 8711—21.
12. Bevan M., Chilton M.-D. (1982) T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Ann. Rev. Genetics* 16, 357—84.
13. Bevan M., Flavell R., Chilton M.-D. (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant transformation. *Nature* 304, 184—7.
14. Bomhoff G., Klapwijk P. M., Kester H. C. M., Schilperoort R. A., Hernalsteens J.-P., Schell J. (1975) Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 145, 177—181.
15. Byrne M. C., McDonnell R. E., Wright M., Carnes M. G. (1986) Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8, 3—15.
16. Caboche M. (1980) Nutritional requirements of protoplast-derived haploid tobacco cells grown at low cell densities in liquid medium. *Planta* 149, 7—18.
17. Chyi Y.-S., Jorgensen R. A., Goldstein D., Tanksley S. D., Loaiza-Figueroa F. (1986) Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.* 204, 64—9.
18. Chilton M.-D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempé J. (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the plant root cells. *Nature* 295, 432—4.
19. Conger B. V. (1981) Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press, Boca Raton, Florida.
20. David C., Chilton M.-D., Tempé J. (1984) Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Biotechnology* 2, 73—6.

21. Deak M., Kiss G. B., Koncz C., Dudits D. (1986) Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rpts.* 5, 97—100.
22. De Frammond A. J., Back E. W., Chilton W. S., Kayes L., Chilton M.-D. (1986) Two unlinked T-DNAs can transform the same tobacco plant cell and segregate in the F₁ generation. *Mol. Gen. Genet.* 202, 125—31.
23. De Grove H., Leemans J., Hernalsteens J.-P., Thia-Toong L., De Beuckeleer M., Willmitzer L., Otten L., Van Montagu M., Schell J. (1982) Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions. *Nature* 300, 752—5.
24. Dixon R. A., ed. (1985) *Plant Cell Culture—A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
25. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., eds. (1986) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 4. Macmillan Publishing Co., New York.
26. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y., eds. (1983) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1. Macmillan Publishing Co., New York.
27. Fillatti J. J., Sellmer J., McCown B., Haissig B., Comai L. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* 206, 192—9.
28. Flick C. E., Evans D. A., Sharp W. R. (1983) Organogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 1, pp. 13—81. Eds. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y. Macmillan Publishing Co., New York.
29. Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Sanders P. R., Flick J. S., Adams S., Bittner M., Brand L., Fink C. L., Fry J., Galluppi G., Goldberg S., Hoffman N. L., Woo S. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4803—7.
30. Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Eichholtz D. A., Flick J. S., Fink C. L., Hoffman N. L., Sanders P. R. (1985) The SEV system. A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *Biotechnology* 3, 629—35.
31. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of a suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151—8.
32. Giles K. L. (1983) Plant protoplasts. *Int. Rev. Cyt. Supplement* 16.
33. Guerche P., Jouanin D., Tepfer D., Pelletier G. (1987) Genetic transformation of oilseed rape (*Brassica napus*) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and analysis of inheritance of the transformed phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 206, 382—6.
34. Gurlitz R. H. G., Lamb P. W., Matthysse A. G. (1987) Involvement of carrot cell surface proteins in attachment of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 83, 546—68.
35. Hamil J. D., Prescott A., Martin C. (1987) Assessment of the efficiency of cotransformation of the T-DNA of disarmed binary vectors derived from *Agrobacterium tumefaciens* and the T-DNA of *A. rhizogenes*. *Plant Mol. Biol.* 9, 573—84.
36. Helmer G., Casadaban M., Bevan M., Kayes L., Chilton M.-D. (1984) A new chimeric gene as a marker for plant transformation: The expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in sunflower and tobacco cells. *Biotechnology* 2, 520—7.
37. Herrera-Estrella L., De Block M., Massens E., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M., Schell J. (1983a) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2, 987—95.
38. Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. (1983b) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209—13.
39. Horsch R., Fraley R., Rogers S., Sanders P., Lloyd A., Hoffman N. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223, 496—8.
40. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., Fra-

- ley R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229—31.
41. Horsch R., Jones G. (1980) A double filter paper technique for plating cultured plant cells. *In vitro* **16**, 103—8.
42. Hu C. Y., Wang P. J. (1983) Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, pp. 177—227. Eds. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y. Macmillan Publishing Co., New York.
43. Hussey G. (1986) Vegetative propagation of plants by tissue culture. In: Plant Cell Culture Technology. Botanical Monographs, Vol. 23, pp. 29—66. Ed. Yeoman M. M. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
44. Inzé D., Follin A., Van Lijsebettens M., Simoens C., Genetello C., Van Montagu M., Schell J. (1984) Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 265—74.
45. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901—7.
46. Jensen J. S., Marcker K. A., Otten L., Schell J. (1986) Nodule-specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* **321**, 669—74.
47. Koncz C., Olsson O., Langridge W. H. R., Schell J., Szalay A. A. (1987) Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 131—5.
48. Lloyd A. M., Barnason A. R., Rogers S. G., Byrne M., Fraley R. T., Horsch R. (1986) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* **234**, 464—6.
49. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R. (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rpts.* **5**, 81—4.
50. Márton L., Wullems G. J., Molendijk L., Schilperoort R. A. (1979) *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **227**, 129—31.
51. Matthysse A. G. (1986) Initial interaction of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **13**, 281—307.
52. Meyer P., Walgenbach E., Bussmann K., Hombrecher G., Saedler H. (1985) Synchronized tobacco protoplasts are efficiently transformed by DNA. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 269—76.
53. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473—97.
54. Neff N. T., Binns A. N., Brandt C. (1987) Inhibitory effects of a pectin-enriched tomato cell wall fraction on *Agrobacterium tumefaciens* binding and tumour formation. *Plant Physiol.* **83**, 525—8.
55. Ooms G., Bains A., Burrell M., Karp A., Twell D., Wilcox E. (1985a) Genetic manipulation in cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*) using *Agrobacterium*. *Theor. Appl. Genet.* **71**, 325—9.
56. Ooms G., Bakker A., Molendijk L., Wullems G. J., Gordon M. P., Nester E. W., Schilperoort R. A. (1982) T-DNA organisation in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell* **30**, 589—97.
57. Ooms G., Karp A., Burrell M. M., Twell D., Roberts J. (1985b) Genetic modification of potato development using Ri T-DNA. *Theor. Appl. Genet.* **70**, 440—6.
58. Ow D. W., Wood K. V., Deluca M., De Wet J. R., Helinski D. R., Howell S. H. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**, 856—9.

59. Paszkowski J., Shillito R. D., Saul M., Mandak V., Hohn B., Potrykus I. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3, 2717—22.
60. Petit A., Berkaloﬀ A., Tempé J. (1986) Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. *Mol. Gen. Genet.* 202, 388—93.
61. Petit A., Stougaard J., Kuhle A., Marcker K. A., Tempé J. (1987) Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*. A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 207, 245—50.
62. Pollock K., Barfield D. G., Robinson S. J., Shields R. (1985) Transformation of protoplast-derived cell colonies and suspension cultures by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rpts.* 4, 202—5.
63. Sacristian M. D., Melchers G. (1977) Regeneration of plants from habituated and *Agrobacterium*-transformed single cell clones of tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 152, 111—17.
64. Sanders P. R., Winter J. A., Barnason A. R., Rogers S. G., Fraley R. T. (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* 15, 1543—58.
65. Scott R. J., Draper J. (1987) Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells. A useful model system for gene expression studies in plants. *Plant Mol. Biol.* 8, 265—74.
66. Shah D. M., Horsch R. B., Klee H. J., Kishorer G. M., Winter J. A., Tumer N. E., Hironaka C. M., Sanders P. R., Gasser C. S., Aykent S., Siegel N. R., Rogers S. G., Fraley R. T. (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233, 478—81.
67. Shahin E. A., Simpson R. B. (1986) Gene transfer system for potato. *Hort. Sci.* 21, 1199—201.
68. Shahin E. A., Spielmann A., Sukhapinda K., Simpson R. B., Yashar M. (1986a) Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop Sci.* 26, 1235—9.
69. Shahin E. A., Sukhapinda K., Simpson R. B., Spivey R. (1986b) Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*; transgenic plants with normal phenotypes harbour binary vector T-DNA but no Ri plasmid T-DNA. *Theor. Appl. Genet.* 72, 770—7.
70. Sharp W. R., Evans D. A., Ammirato P. V., Yamada Y., eds. (1984) Handbook of plant cell culture, Vol. 2. Macmillan Publishing Co., New York.
71. Sheikholeslam S. N., Weeks D. P. (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 8, 291—8.
72. Simpson R. B., Spielmann A., Margossian L., McKnight T. D. (1986) A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol. Biol.* 6, 403—15.
73. Stachel S. E., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P. (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318, 624—29.
74. Stachel S. E., Timmerman B., Zambryski P. (1986) Generation of single stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322, 706—12.
75. Stachel S. E., Zambryski P. (1986) *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell. A novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. *Cell* 47, 155—7.
76. Sukhapinda K., Spivey R., Shahin E. A. (1987) Ri-plasmid as a helper for introducing vector DNA into alfalfa plants. *Plant Mol. Biol.* 8, 209—216.
77. Tepfer D. (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37, 959—67.

78. Trulson A. J., Simpson R. B., Shahin E. A. (1986) Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. Theor. Appl. Genet. 73, 11—15.
79. Umbeck P., Johnson G., Barton K., Swain W. (1987) Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. Biotechnology 5, 263—6.
80. Van den Elzen P. J. M., Townsend J., Lee K. L., Bedbrook J. R. (1985) A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. Plant Mol. Biol. 5, 299—302.
81. White D. W. R., Greenwood D. (1987) Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. Plant Mol. Biol. 8, 461—9.
82. Yamada T., Palm C., Brooks B., Kosuge T. (1985) Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastoni* indolacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6522—6.
83. Yeoman M. M. (1986) Plant cell culture technology. Botanical Monographs, Vol. 23. Blackwell, Scientific Publications Oxford.
84. Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2, 2143—50.
85. Zhang H., Somerville C. R. (1987) Transfer of the maize transposable element *Mu1* into *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 48, 165—73.

Трансформация растительных клеток путем трансфекции ДНК

Дж. Дрейпер, Р. Скотт, А. Кумар, Г. Дьюри

3.1. Введение

3.1.1. Ограничения системы трансформации с помощью агробактерий

В гл. 1 и 2 рассмотрены различные пути использования систем переноса генов агробактерий для трансформации растительных клеток. Векторы на основе агробактерий продолжают совершенствоваться и конструироваться для специальных целей и, вероятно, будут использоваться еще некоторое время. Однако существует ряд причин, по которым необходимы альтернативные пути трансформации.

Круг хозяев

Основной недостаток системы агробактерий — это неспособность трансформировать злаковые, группу, к которой относится большинство растений, употребляемых в пищу. Причина подобного ограничения круга хозяев в настоящее время не понятна; она, возможно, заключается в отсутствии участков узнавания для бактерий на поверхности растительной клетки или в неспособности одного или более продуктов *vir*-генов правильно функционировать в клетках однодольных. Однако следует отметить, что проблема круга хозяев не ограничивается только однодольными. В самом деле, для многих культурных видов двудольных до сих пор не разработаны эффективные системы трансформации с помощью агробактерий (приложение 2[VIII]). Ткани-мишени некоторых видов растений, возможно, не в состоянии противостоять инфекции агробактериями либо чувствительны к бактерицидным соединениям, и это препятствует трансформации.

Проблемы регенерации

Очень часто культивируемые *in vitro* клетки, которые способны к трансформации с высокой частотой, не являются тотипотентными, например полученные из протопластов клетки или хорошо адаптировавшиеся суспензионные культуры. Таким образом, в случае многих видов необходимо трансформировать

ткани/клетки, способные к регенерации, но труднодоступные для агробактерий (например, клетки семязпочки или пыльцы).

Организация Т-ДНК

Сайт(ы) интеграции, число копий и общая организация Т-ДНК может не подходить для последующих манипуляций и накладывать ограничения на применение векторов на основе Т-ДНК. Это особенно важно, если необходимо направленное встраивание гена, как, например, при его замещении путем гомологичной рекомбинации. Однако необходимо получить гораздо больше данных об организации Т-ДНК, прежде чем можно будет разрабатывать эту проблему.

Работа с рекомбинантными ДНК

Из-за размера и сложности Ti-плазмиды для получения полноценного трансформирующего вектора требуется провести ряд генно-инженерных манипуляций. С генами, предназначенными для переноса в растительные клетки, сначала манипулируют *in vitro* и в зависимости от того, становятся ли они частью коинтегративной или бинарной векторной системы, их включают в состав либо простой челночной плазмиды (коинтегративная система), либо более сложной плазмиды с широким кругом хозяев (бинарная система). Плазмиду затем вводят в *E. coli* и, наконец, переносят в агробактерии путем сложной конъюгации (разд. 1.10), называемой трехродительским скрещиванием. Для бинарных векторов требуется репликон с широким кругом хозяев, увеличивающий размер вектора, что приводит к меньшему числу копий в *E. coli*. Следовательно, такой бинарный вектор более трудно выделить, чем стандартный клонирующий вектор. Кроме того, репликоны с широким кругом хозяев, как правило, относительно нестабильны, и их следует постоянно держать под селективным давлением. Наконец, они, как правило, содержат небольшое число уникальных рестрикционных сайтов, пригодных для клонирования. С коинтегративными векторами, такими, как pGV3850 (гл. 1), еще труднее манипулировать, поскольку коинтеграция происходит с низкой частотой. Трехродительские скрещивания, используемые в обеих системах для переноса плазмиды из *E. coli* в агробактерии, также относительно неэффективны, и на их завершение требуется 2—3 дня. Низкая частота получения трансконъюгантов в трехродительских скрещиваниях и низкое число копий как бинарного, так и коинтегративного векторов в агробактериях обуславливают необходимость проведения скрининга селектированных колоний путем блоттинг-гибридизации по Саузерну. Она должна подтвердить, что перенос/коинтеграция осуществились и не произошло нежелательной рекомбинации. Процедуры конъюгации и блоттинг-

гибридизации по Саузерну отнимают много времени и усложняют эксперименты по трансформации растений. Поэтому возникает необходимость в процедуре переноса генов без использования агробактерий в качестве промежуточного хозяина.

3.1.2. Трансформация растительных протопластов изолированной векторной ДНК

Чтобы упростить манипуляции с ДНК и частично решить проблему ограничения круга хозяев, растительные протопласты трансформируют путем непосредственного введения векторной ДНК. Однако сразу же следует подчеркнуть, что, хотя в настоящее время теоретически возможна трансформация практически любой системы протопластов, проблема регенерации трансформированных растений из полученных на основе протопластов тканей окончательно не решена. Поэтому трансформация протопластов имеет ограниченное применение (некоторые возможности ее использования обсуждаются ниже):

Введение нуклеиновых кислот в растительные протопласты нельзя считать новым методом. Уже в течение многих лет его используют для изучения распространения, репликации и экспрессии вирусов растений. Действительно, большинство современных методов введения векторной ДНК в протопласты растений было первоначально разработано для вирусных нуклеиновых кислот и основывалось на аналогичных подходах, используемых при работе с вирусами животных.

Идеальная система трансформации с помощью чистой ДНК должна:

- защищать векторную ДНК от нуклеаз или механической дегградации;
- обеспечивать эффективное введение векторной ДНК в протопласты;
- не быть цитопатогенной, обеспечивать достаточно высокую эффективность разделения клеток и не вызывать значительного снижения их жизнеспособности после трансфекции;
- доставлять вектор в форме, способной к интеграции с ядерным геномом или, если необходимо, к существованию в виде свободного репликона;
- преодолевать барьер некомпетентности растительных клеток.

В целом методы введения ДНК в протопласты можно разделить на пять основных групп:

1. Химически стимулированный эндоцитоз (ПЭГ 6000).
2. Введение с помощью липосом.
3. Слияние бактериальных сферопластов.
4. Электропорация.
5. Микроинъекции.

Введение ДНК с помощью липосом и трансформация протопластов путем слияния с бактериальными сферопластами, содержащими векторные плазмиды, использовались с переменным успехом [8, 16]. Последний метод оказался относительно неэффективным и более трудоемким, чем трансформация путем химически стимулируемого эндоцитоза или электропорации, и не будет рассматриваться в данном руководстве. Таким образом, в разд. 3.2 и 3.3 мы остановимся соответственно на методах химически стимулируемого поглощения ДНК и электропорации. Микроинъекции могут использоваться для трансформации клеток, а не протопластов и обсуждаются отдельно в разд. 3.4.

3.1.3. Разработка стратегий трансформации протопластов путем трансфекции ДНК

Несколько лет назад было показано, что протопласты растений можно трансформировать Ti-плазмидой дикого типа с помощью химически стимулируемого эндоцитоза [10, 21]. Оказалось, что методы, предусматривающие использование полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000), наиболее надежны, хотя частота трансформации довольно низка ($1-5 \times 10^{-6}$). Она до некоторой степени зависела как от концентрации ПЭГ, так и от количества векторной ДНК. К сожалению, данные эксперименты ограничивались трудностью выделения больших количеств Ti-плазмиды и недостатками гормоннезависимого роста в качестве селективного фенотипа. В целом результаты разочаровывали. Было обнаружено, что во многих трансформированных колониях интегрированы только фрагменты Ti-плазмиды и повторы длиной 25 п. н. не использовались для интеграции. Только после 1984 г. с появлением доминантных селективных маркерных генов, которые эффективно транскрибируются и транслируются в растительных клетках [3, 18], возобновились эксперименты по переносу генов посредством ДНК (DMGT, от англ. DNA-mediated gene transfer) и конструированию соответствующих векторов.

Современные DMGT-векторы представляют собой небольшие плазмиды (см. следующий раздел), как правило, содержащие множественные сайты для клонирования, гены резистентности к антибиотикам, приспособленные для функционирования в растительных клетках либо в качестве доминантных селективных маркеров, либо в экспериментах по кратковременной (транзиторной) экспрессии, и, кроме того, прокариотические гены устойчивости к антибиотикам для селекции в бактериях (рис. 3.1). С этими малыми плазмидами манипулируют *in vitro*, чтобы получить вектор в окончательном виде, а затем вводят

его в *E. coli* с помощью стандартной процедуры трансформации. Небольшой размер и ослабленный контроль репликации DMGT-векторов, дающий высокое число копий, означают, что их можно выделять в миллиграммовых количествах из *E. coli* стандартными методами и что они гораздо меньше подвержены механическим повреждениям.

Доступность относительно больших количеств векторной ДНК с эффективно экспрессирующимися селективными/скринируемыми генами возродила интерес к трансформации посредством ДНК, и многие исследователи быстро оптимизировали целый набор методик для достижения эффективной доставки векторной ДНК в растительные протопласты, подразумевающие использование липосом, полиэтиленгликоля и электропорацию



Рис. 3.1. Общая схема строения вектора для переноса генов посредством ДНК.

[8, 15, 31]. В большинстве экспериментов качество и количество плазмидной ДНК, поглощаемой протопластами, оценивались физическими методами, например гибридизацией ДНК (блоттинг-гибридизация по Саузерну), или косвенно путем транзитной экспрессии маркерных генов либо селекции резистентных к антибиотику, стабильно трансформированных колоний.

Впоследствии оказалось, что методики, использованные ранее для получения эффективной трансформации протопластов Ti-плазмидой, обеспечивают и оптимальное поглощение малых плазмидных векторов [9, 11]. В настоящее время эндоцитоз с помощью ПЭГ и электропорация могут быть использованы для эффективного включения малых векторных плазмид в протопласты с частотой трансформации от 10^{-4} до $2 \cdot 10^{-2}$ [15, 31, 38]. Введение векторной ДНК в синхронизированные протопласты, находящиеся в S-фазе и митозе, повышает эффективность трансформации еще в 3—5 раз [25, 30]. Высказано предположе-

ние, что отсутствие ядерной мембраны в митотических клетках способствует проникновению ДНК в ядра [30]. Особенно важно отметить, что методы переноса генов посредством ДНК (DMGT) можно использовать для трансформации протопластов как однодольных, так и двудольных растений. В этом случае трансформация уже не зависит от того, происходит ли экспрессия селективных маркерных генов или резистентности к антибиотикам в качестве селективного признака [24, 42].

Как и при трансформации с помощью целой Тi-плазмиды, быстро выяснилось, что повторы длиной 25 п. н., встроенные в малые DMGT-векторы, не используются для интеграции в растительную ДНК, и, таким образом, их необязательно вводить в состав вектора. Действительно, было обнаружено, что любые участки вектора могут рекомбинировать с ДНК клетки-хозяина. По этой причине в результате трансформации возникают клетки, содержащие самое различное число копий перенесенного гена и самые разнообразные вставки, включая отдельные копии плазмиды, фрагменты плазмид, конкатемеры и перемешанные последовательности вектора.

3.1.4. Векторы для переноса генов посредством ДНК (DMGT-векторы)

Прямой перенос генов в протопласты обычно осуществляют либо для получения стабильно трансформированных клеточных линий, либо для проверки временной экспрессии гена с целью тестирования новых конструкций. В последнем случае практически любой малый клонирующий вектор можно использовать для доставки нужного гена, тогда как для получения стабильной трансформации DMGT-вектор должен нести эффективно экспрессирующийся селективный маркерный ген, например ген устойчивости к канамицину или гигромицину (табл. 2.1). Кроме того, векторы с эффективно экспрессирующимися конструкциями, кодирующими продукт, для тестирования которого известен чувствительный метод (например, рCaMVCAT), часто используют в экспериментах по временной экспрессии, цель которых состоит в оптимизации процедуры стабильной трансформации.

3.1.4.1. DMGT-векторы для транзитной экспрессии

Один из векторов, специально созданный для переноса генов посредством ДНК, — это рCaMVCAT [12]. Он представляет собой малый клонирующий вектор (рис. 3.2), несущий ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) под контролем промотора 35S РНК из генома СаMV. Промотор СаMV-35S обеспечивает интенсивную нерегулируемую экспрессию перенесенных

генов в трансгенных растениях [32, 37]. Данный вектор очень полезен для разработки эффективных систем доставки ДНК, поскольку за активностью САТ можно следить с помощью очень чувствительного метода (табл. 2.1 и разд. 6.4.2.3), что позволяет оценивать биологическую активность векторной ДНК вскоре после ее поглощения. Недавно различные группы исследователей разработали векторы специально для переноса генов посредством ДНК, которые содержат каскеты для экспрессии генов, состоящие из мультилинкерного сайта, встроенного между сильным промотором и сайтом присоединения poly(A) [2, 32]. Данные векторы удобны для управления экспрессией

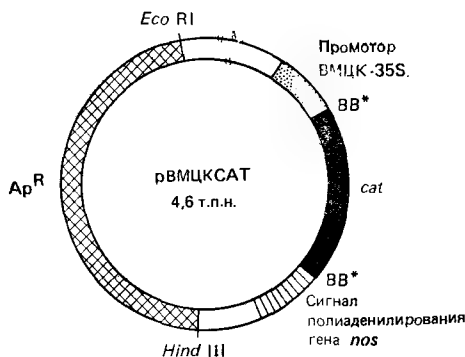


Рис. 3.2. Рестрикционная карта рСаМVCАТ. Ap^R — резистентность к ампициллину; BB^* — липкие концы, образуемые рестриктазами *Bam*HI и *Bgl*II, были соединены таким образом, что в месте стыка рестрикционный сайт не сохранился. (ВМЦК тождественно СаMV.)

любого гена, который может быть встроен в полилинкерный сайт. Таким образом, можно исследовать активность гена с помощью временной экспрессии.

3.1.4.2. DMGT-векторы для стабильной трансформации

Многие удачные DMGT-системы включали небольшие промежуточные векторы, которые обычно используют с неонкогенными *цис*-действующими системами *vir*-помощников (табл. 1.1). К таким векторам относятся рGV1103 и рMON200 [15, 36], и, хотя они содержат по крайней мере один повтор длиной 25 п.н., он не используется при интеграции с ядерным геномом растения. Небольшие бинарные векторы, например рBin19, тоже очень удобны для экспериментов по DMGT-трансформации. Для стабильной трансформации конструкцию с САТ обычно заменяют на доминантный селективный маркер, такой, как ген резистентности к канамицину [13, 31, 43].

После поглощения ДНК протопластам дают возможность восстановить клеточную стенку и поделиться, прежде чем трансформированные колонии селективируют практически так же, как описано для метода совместного культивирования (разд. 2,9); при этом, разумеется, не добавляют бактерицидные антибиотики, уничтожающие агробактерии. Таким образом, после стимуляции включения ДНК клетки обрабатывают так же, как и любую другую популяцию протопластов. Все проблемы, связанные с селекцией трансформированных клеток, идентичны тем, которые возникают при работе с клетками, трансформированными путем совместного культивирования с агробактериями, и поэтому мы не будем возвращаться к их обсуждению.

3.1.5. Трансформация интактных растительных тканей DMGT-векторами

Трансформация протопластов DMGT-векторами с помощью какого-либо из методов, перечисленных в разд. 3.1.2, может быть предпринята по отношению к любому виду растений, для которого разработана система протопластов. Однако даже в этом случае, если жизнеспособные протопласты, способные к формированию клеточной стенки и делению, можно получить в достаточных количествах, у многих культурных видов такие клетки не являются тотипотентными. Таким образом, кроме работ по временной экспрессии, трансформация протопластов с помощью DMGT-векторов в действительности не вышла за пределы круга видов, чувствительных к агробактериям. Кроме того, существуют и значительные основания предполагать, что прохождение клеток через стадию недифференцированной культуры тканей тоже способно привести к изменениям генотипа растения. По этим двум причинам многие лаборатории в настоящее время разрабатывают методы трансформации, которые не нарушают нормальное развитие и клеточный цикл растения.

3.1.5.1. Микроинъекции

Разработка техники микроинъекций оплодотворенных ооцитов революционизировала генную инженерию животных, и в настоящее время существует громадный интерес к манипуляциям репродуктивным процессом растений для целей трансформации путем микроинъекций микроспор, созревающей пыльцы и незрелых зародышей [5].

Однако у этих подходов есть много нерешенных проблем, в том числе:

- 1. Трудность проникновения через растительную клеточную стенку.**

2. Проблемы определения тотипотентных клеток *in planta* и визуализации клеточных ядер.
3. Плохая выживаемость и прекращение нормального развития культивируемых клеток-мишеней, таких, как срезанные двухдневные незрелые зародыши и созревающая пыльца, даже без микроинъекций.
4. Потеря эмбрионного потенциала у изолированных микро-спор большинства культурных видов.

Улучшение методов микроинъекций и микрокультивирования или использование систем оплодотворения *in vitro* в будущем позволит получать растения из подвергшихся микроинъекциям незрелых и зрелых гамет, зигот или ранних зародышей.

3.1.5.2. Методы доставки вектора с помощью «макроинъекций» и стрельбы микрочастицами («микроснарядами»)

Во многих сообщениях 70-х годов предполагалось, что клетки растений могут трансформироваться в результате пассивного поглощения ДНК созревающими семенами или созревающей пылью в рыльце пестика. Однако из-за отсутствия убедительных молекулярных доказательств результаты большинства экспериментов, в которых объявлялось об успехе, считались артефактами.

Многие из этих экспериментов в настоящее время воспроизводят с помощью современных DMGT-векторов, несущих гены, которые легко анализировать (например, *pCaMVCAT*), или которые сообщают доминантный селективный фенотип трансформированным клеткам. Действительно, недавно было показано, что клетки археспор ржи могут поглощать и интегрировать экзогенную плазмидную ДНК, введенную в развивающийся цветковый побег [7]. Поскольку клетки археспор дают начало гаметным тканям, трансформированные семена образуются непосредственно после оплодотворения. Последние идентифицировали путем проращивания в присутствии канамицина, и 7 из 3000 проростков оказались резистентными к антибиотику. Если будет доказана воспроизводимость данного метода «макроинъекций», то он может найти применение и в случае других видов растений.

Последняя разработка — это использование выдержанных в растворе плазмидной ДНК вольфрамовых микрочастиц, чтобы «выстрелить» ДНК в большие клетки эпидермиса лука [19]. Удастся получить достаточно эффективную временную экспрессию доставленных векторных последовательностей, но остается выяснить, можно ли эту технологию применить к тотипотентным клеткам культурных растений.

Методы, описываемые в данной главе, основаны на последних успешных экспериментах по трансформации растений

некоторых видов, и поэтому технологии макроинъекций и микроснарядов обсуждаться не будут. Во всех приведенных ниже экспериментах используют протопласты, полученные из суспензионной культуры клеток мутанта альбиноса *Petunia hybrida*. Эти протопласты легко выделить в больших количествах, они отличаются высокой выживаемостью и очень устойчивы к процедурам введения ДНК. Следует отметить, что упоминаемые процедуры были разработаны именно для этих протопластов и в случае других может потребоваться оптимизация методики (см. примечания).

В разд. 3.2 мы остановимся на том, как определить оптимальные условия для введения векторной ДНК в протопласты в присутствии ПЭГ, оценивая количество используемой ДНК. Поглощение ДНК контролируется с помощью гибридизации, чтобы подтвердить включение векторной ДНК в протопласты. В разд. 3.3 изложены методики электропорации протопластов и оценки эффективности процесса трансформации путем измерения временной экспрессии DMGT-вектора в клетках, полученных из обработанных протопластов. Трансформация протопластов путем макроинъекций описана в разд. 3.4.

3.2. Трансфекция протопластов с помощью полиэтиленгликоля

3.2.1. Основные положения

Полиэтиленгликоль представляет собой сильно гидрофильное вещество и способен связывать много «свободной воды» в растворе; «свободная вода» — это молекулы, доступные для взаимодействия с заряженными молекулами (обычно ионами), растворенными в воде. Таким образом, при высоких концентрациях ПЭГ такие макромолекулы, как ДНК, больше не могут оставаться в растворе и осаждаются. Мембрана протопласта в норме отрицательно заряжена. Благодаря фосфатным группам ДНК тоже имеет отрицательный заряд, и, следовательно, взаимное отталкивание зарядов препятствует взаимодействию между ДНК и протопластами. При очень высоких концентрациях (30—40% вес на объем) ПЭГ также, по-видимому, минимизирует взаимное отталкивание зарядов; таким образом, клеточные мембраны могут прийти в тесный контакт с возможным слиянием липидных бислоев и впоследствии после разведения со слиянием клеток. Было показано, что полиэтиленгликоль представляет собой и сильный стимулятор эндоцитоза у протопластов растений; при добавлении ПЭГ они способны поглощать большие частицы, например целые хлоропласты, липосомы или

бактерии. Таким образом, общий механизм воздействия ПЭГ не совсем ясен, однако, вероятно, подразумевает преципитацию плазмидной ДНК на плазматической мембране и затем стимуляцию ее поглощения путем эндоцитоза.

Многие другие гидрофильные полимеры с длинной цепью (например, поливиниловый спирт), длинноцепочечные катионы (например, поли- α -орнитин, поли- α -лизин и полианион декстрансульфат) и высокие концентрации дивалентных ионов (например, Zn^{2+} и Cu^{2+}) тоже использовались для стимуляции поглощения ДНК [9]. В отличие от остальных веществ ПЭГ гораздо менее токсичен по отношению к большинству протопластов, и, как правило, можно подобрать такую концентрацию, при которой достигается хороший уровень поглощения ДНК при незначительном повреждении клеток. Концентрация ПЭГ 6000 в интервале 15—25% и 5 мкг плазмиды на 10^6 протопластов могут стимулировать поглощение до 1000 копий плазмиды на протопласт [11]. Существуют некоторые основания считать, что частота трансформации возрастает с концентрацией векторной ДНК. Верхний предел количества ДНК, которое может взаимодействовать с протопластами в присутствии ПЭГ не вызывая заметных повреждений, вероятно, составляет около 50—200 мкг на 10^6 протопластов в зависимости от источника последних. Если используют более высокие, чем 25%, концентрации ПЭГ, то увеличиваются и степень повреждения клеток, и частота их слипания, что затрудняет получение трансформантов.

В данном разделе мы останавливаемся на том, как определить оптимальную концентрацию ПЭГ 6000 для эффективного поглощения плазмиды протопластами растений. Однако ту же самую схему можно использовать и для оптимизации других параметров (например, подбора ДНК-носителя, среды для поглощения, pH, времени и температуры инкубации, концентрации ДНК, условий перемешивания и предварительной обработки протопластов), которые предположительно влияют на процесс поглощения. После стимуляции эндоцитоза любая плазида, адсорбированная на внешней стороне протопластов, удаляется с помощью ДНКазы. Затем из заданного количества протопластов выделяют суммарную ДНК и оценивают количество встроенного в нее вектора с помощью ДНК-ДНК-гибридизации, используя радиоактивно меченную ДНК вектора в качестве пробы. Кроме того, для установления целостности поглощенной векторной ДНК можно использовать блоттинг-гибридизацию по Саузерну [11]. Такие методы в сочетании с анализом временной экспрессии вектора в обработанных плазмидой клетках позволяют быстро оптимизировать процедуры трансформации с помощью ПЭГ.

3.2.2. Стимулируемое ПЭГ поглощение ДНК протопластами⁶⁾

3.2.2.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований и материалы для культуры тканей (приложения 1[I] и 2[I]).
- Настольная центрифуга MSE Centaur 2 (или равноценная).
- Стерильные центрифужные пробирки на 13 мл (например, Sarstedt, тип 67.540), $\times 20$.
- Водяная баня на 28°C.
- Гемоцитометр (конструкции Фукса — Розенталя).
- Фазово-контрастный микроскоп с объективом Nikon, $\times 10$ (или равноценный).
- Центрифужные пробирки, содержащие по 1 мл свежеизолированных протопластов в концентрации 3×10^6 клеток/мл (например, протопласты суспензионной культуры альбиноса *Petunia hybrida*, приложение 3[I]).

Растворы

- Плаزمида со скринируемым маркерным геном для анализа временной экспрессии (например, pCaMVCAT) в дистиллированной H_2O (150 мкл с концентрацией 1 мкг/мл) на льду.
- Среда для культивирования протопластов (например, 80 мл MSP1 9M, приложение 2[II]).
- Среда для отмывания протопластов (например, 80 мл CPW 9M, приложение 2[V]).
- Растворы для трансфекции ДНК (по 5 мл) в стандартных пробирках. Например:
 - MSPC 9M (контроль)
 - 5%-ный ПЭГ 6000 в MSP1 9M
 - 10%-ный ПЭР 6000 в MSP1 9M
 - 20%-ный ПЭГ 6000 в MSP1 9M

} приложение 2[II]

3.2.2.2. Методика

Приготовление суспензионной культуры протопластов альбиноса *Petunia hybrida* описано в приложении 3[I]. Методики получения суспензионной культуры протопластов в других случаях и другие системы протопластов должны быть разработаны с помощью специальных экспериментов.

1. Берут четыре^{в)} центрифужные пробирки, каждая из которых содержит по 2×10^6 протопластов в 1 мл ростовой среды (например, MSP1 9M), — по одной пробирке для каждой

концентрации ПЭГ:

Проба 1: 0%-ный ПЭГ.

Проба 2: 5%-ный ПЭГ.

Проба 3: 10%-ный ПЭГ.

Проба 4: 20%-ный ПЭГ.

Осаждают протопласты при 400 об/мин в течение 7 мин.

2. Удаляют супернатант с помощью стерильной пастеровской пипетки, оставляя тонкий слой среды на поверхности осадка.
3. Добавляют 20 мкл раствора плазмиды ¹⁾ к осадку с помощью стерильного наконечника автоматической микропипетки Gilson P200. Осторожно ресуспендируют осадок с помощью пастеровской пипетки и оставляют при комнатной температуре на 1 мин²⁾.
4. Добавляют к осадкам по 2 мл соответствующего раствора³⁾ ПЭГ⁴⁾ или контрольного раствора (MSP1 9M), дав им стечь по стенке пробирки с высоты 1 см над осадком. Ресуспендируют протопласты путем вращения пробирки между ладонями пока не будет получена тонкая суспензия. Инкубируют при 28°C⁵⁾ 30 мин, иногда перемешивая.
5. Разводят инкубационную смесь, медленно добавляя 10 мл MSP1 9M (по 2 мл каждые 3 мин), и затем осаждают протопласты (400 об/мин, 10 мин)⁶⁾.
6. Осторожно ресуспендируют протопласты в 1 мл MSP1 9M⁷⁾.
7. Добавляют 10 мкл раствора ДНКазы. Инкубируют при комнатной температуре 30 мин.
8. Добавляют 10 мл CPW 9M, осторожно перемешивают и затем осаждают протопласты (400 об/мин, 10 мин). Отмывают еще раз в CPW 9M и ресуспендируют в 1 мл CPW 9M.
9. Подсчитывают число выживших протопластов⁸⁾ с помощью гемоцитометра⁹⁾.
10. Переходят к процедуре выделения ДНК.

3.2.3. Выделение ДНК из протопластов и дот-блоттинг-гибридизация

3.2.3.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Материалы для олигонуклеотидного мечения и гибридизации ДНК (разд. 5.6 и 5.5).
- Водяная баня на 56°C.
- Фильтр Hybond-N (Amersham, 8×3 см).
- Кипящая водяная баня.
- Вакуумная печь на 80°C.

Растворы

- 3×SSC (разд. 5.4.2).
- Раствор ДНКазы (100 мкл в пробирке Эппендорф) на льду [4 мг/мл ДНКазы I (Sigma) в 20 mM MgCl₂].
- Растворы для выделения ДНК (20 мл):

1×СТАВ-буфер для экстракции	}	разд. 4.2.2.1.
3×СТАВ-буфер —»—		
10×СТАВ-буфер —»—		
СТАВ-буфер для осаждения		
- 1M NaCl.
- 9%-ный маннитол в дистиллированной H₂O.
- Хлороформ/октанол (24:1) в стеклянных стандартных пробирках.
- Этанол (100%, 85%, 65%) в дистиллированной H₂O.
- Стандартные растворы плазмиды (например, pCaMV₃CAT) для реконструкционных экспериментов по дот-блоттинг-гибридизации^{a)}:

A×1000 (1,15 нг/мкл)	}	5 мкл каждого во льду.
B×500 (0,58 нг/мкл)		
C×100 (0,12 нг/мкл)		
D×50 (0,06 нг/мкл)		
- Раствор для денатурации (1 M NaCl, 0,1 M NaOH, 10 mM ЭДТА).
 На 100 мл:

5 M NaCl	20,0 мл
NaOH	0,4 г
0,5 M ЭДТА, pH 8,0	2,0 мл.

3.2.3.2. Методика**Выделение ДНК из протопластов**

1. Отбирают равные по объему аликвоты (1—3 млн.^{н)} протопластов), помещают в пробирку Эппендорф и осаждают (1 мин). Ресуспенсируют в 350 мкл 9%-ного маннитола.
2. Лизируют протопласты путем быстрого пипетирования с помощью микропипетки Gilson P1000 в 250 мкл 3×СТАВ-буфера для экстракции. Встряхивают, чтобы разбить возможные агрегаты дебриса растительных клеток, и инкубируют при 46°C 10 мин^{о)}.
3. Дают остыть 5 мин и затем добавляют 500 мкл смеси хлороформ/октанол (24:1), перемешивают до образования эмульсии, перевертывая пробирку.

4. Разделяют фазы путем центрифугирования (5 мин). Переносят водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку Эппендорф. На поверхность интерфазы добавляют еще 100 мкл 1×СТАВ-буфера для экстракции, затем отсасывают его и объединяют с ранее отобранной из той же пробирки водной фазой.
5. Добавляют 60 мкл 10%-ного СТАВ-буфера к водной фазе. Перемешивают и затем повторяют экстракцию смесью хлороформ/октанол (24:1). На этот раз удаляют водную фазу очень тщательно (избегая попадания дебриса) в новую пробирку Эппендорф и добавляют равный объем СТАВ-буфера для осаждения (приблизительно 600 мкл). Оставляют при комнатной температуре на 20 мин для осаждения.
6. Собирают осадок путем кратного (2—10 с) осаждения в микроцентрифуге. Важно, чтобы осадок не был слишком компактным, в противном случае его очень трудно растворить.
7. Растворяют осадок в 400 мкл 1 М NaCl (нагревают до 56 °С, если необходимо) и переносят в чистую пробирку Эппендорф. Добавляют два объема 100%-ного этанола (800 мкл) и осаждают нуклеиновые кислоты при —70 °С в течение 20—30 мин в бане сухой лед/этанол.
8. Собирают осадок нуклеиновых кислот (3 мин) и дважды промывают 65%-ным этанолом и один раз 85%-ным. Если осадок всплыл, то центрифугирование повторяют (3 мин)^а.
9. Высушивают под вакуумом и приступают к процедуре дот-блоттинг-гибридизации^в.

Оценка количества вектора, захваченного при эндоцитозе, путем дот-блоттинг-гибридизации

1. Снова растворяют каждый образец в 4 мкл раствора для денатурации.
2. Прогревают 5 мин при 100 °С на кипящей водяной бане. Одновременно следует прокипятить образцы ДНК для эксперимента по реконструкции.
3. Берут фильтр Hybond-N размером 8×3 см и отмечают карандашом 8 пятен (2 ряда по 4 точки).
4. Осторожно наносят образцы на фильтр Hybond-N с помощью микропипетки Gilson P20, один образец на каждую точку в одном ряду, записав порядок нанесения. На точки в другом ряду наносят по 4 мкл образцов ДНК для эксперимента по реконструкции.
5. Подсушивают фильтр 3 мин, а затем ополаскивают в 3×SSC в течение 2 мин. Помещают между согнутыми в несколько слоев листами фильтровальной бумаги Whatman 3 MM, а затем прогревают в печи 30 мин при 80 °С. Фиксируют

ДНК на фильтре Hybond-N путем облучения ультрафиолетом (разд. 5.4.3)^{c)}.

6. Приступают к процедуре гибридизации и автордиографии (разд. 5.5), используя в данном случае радиоактивно меченный фрагмент векторной плазмиды pCaMVCAT в качестве пробы (разд. 6.2.).
7. Пример типичных результатов дот-блоттинг-гибридизации и данные по выживаемости протопластов из эксперимента по трансфекции ДНК с помощью ПЭГ представлены на рис. 3.3 и в табл. 3.1 соответственно. Можно оценить количество ДНК, захваченной при эндоцитозе после каждой обработки

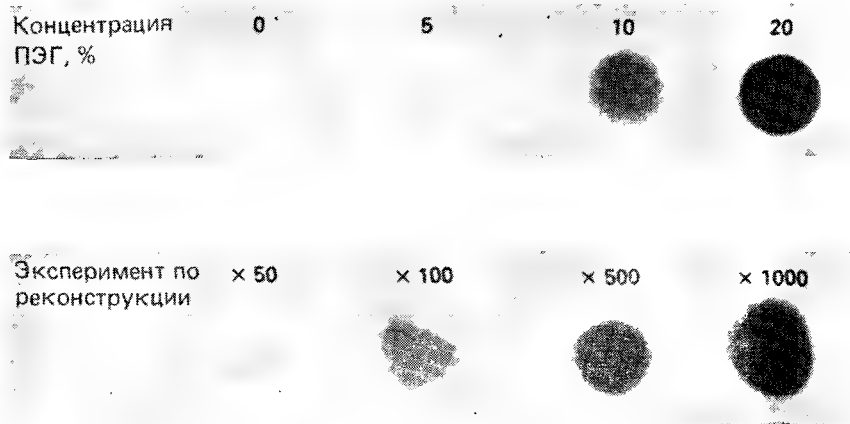


Рис. 3.3. Оценка эффективности трансфекции протопластов *P. hybrida* с помощью ПЭГ путем дот-блоттинг-гибридизации ДНК. Показаны результаты реконструкционного эксперимента по дот-гибридизации: $\times 50$, $\times 100$, $\times 500$ и $\times 1000$ копий плазмиды на протопласт и влияние концентрации ПЭГ на поглощение плазмиды.

ПЭГ, путем сравнения интенсивности сигнала гибридизации на радиоавтографах дотов экспериментальных образцов по сравнению с контрольными.

Выбирают подходящую концентрацию ПЭГ для будущего анализа временной экспрессии и экспериментов по трансформации, которая бы обеспечивала хорошее поглощение вектора и адекватную выживаемость протопластов. В данном эксперименте эта концентрация составляет 20%.

Примечания

- a) Подобные стандартные растворы плазмид приготавливают таким образом, чтобы получить определенное число копий векторной плазмиды по отношению к числу выделенных протопластов (1 млн.). 4 мкл каждого

Таблица 3.1. Выживаемость протопластов в результате поглощения ДНК в присутствии ПЭГ

Концентрация ПЭГ, %	Выживаемость протопластов, %	Число копий плазмиды на протопласт
0	52	<50
5	50	100
10	46	250
20	42	1000

раствора содержат эквивалент

A×1000,

B×500,

C×100,

D×50 копий плазмиды на выделенный протопласт.

- б) Данный эксперимент можно осуществить в полустерильных условиях при попытках оптимизации условий поглощения ДНК. Однако, используя метод для трансформации, следует принимать строгие предосторожности в отношении стерильности.
- в) В системах, где протопласты можно выделить только в небольших количествах, процедура трансфекции может осуществляться в уменьшенном масштабе путем соответствующего доведения объемов. В этих условиях иногда предпочтительнее использовать камеры для микрокультивирования и питающие культуры (разд. 3.4.2.3).
- г) В некоторых успешных методиках поглощения ДНК с помощью ПЭГ используют ДНК-носитель преимущественно для того, чтобы нейтрализовать влияние любого неспецифического связывания или деградации векторной ДНК во время поглощения [31, 38, 42, 43]. Однако ясно, что неспецифическая ДНК-носитель тоже включается в ядерный геном трансформированных тканей растения; последствия этого процесса в настоящее время не известны. Добавление векторной ДНК в виде копреципитата с фосфатом кальция может быть предпочтительнее [21]. В этом случае состав поддерживающих сред для протопластов может быть изменен. Есть некоторые данные, что более высокие частоты трансформации могут быть получены при использовании ДНК вектора, переведенной в линейную форму.
- д) После добавления плазмиды время до внесения ПЭГ без ущерба для процедуры трансформации может составлять 5 мин [42].
- е) Используемый авторами книги ПЭГ 6000 был поставлен фирмой Koch-Light Laboratories несколько лет назад и с тех пор они успешно с ним работают. Разумно проверить несколько образцов ПЭГ 6000 от различных поставщиков, поскольку качество ПЭГ 6000 значительно варьирует. Как правило, низкомолекулярные примеси, например токоферол, частично обуславливают характеристики этого вещества, влияющие на стимуляцию слияния и эндцитоз. Часто случается, что одна партия ПЭГ может быть вредной для клеток при используемых высоких концентрациях, а другая — нет.
- ж) Вполне вероятно, что оптимальная концентрация ПЭГ должна быть уменьшена. В большинстве случаев необходимо уравновесить эффективное поглощение ДНК с приемлемым уровнем потерь протопластов. Кроме того, следует отметить, что протопласты, выделенные из некоторых источников, при высоких концентрациях ПЭГ могут формировать агрегаты и/или сливаться.

- а) Для оптимизации частоты трансформации или эндоцитоза ДНК можно тестировать температуру инкубации в интервале 20—35 °C и длительность обработки ПЭГ.
- б) Раствор калция с высокой ионной силой, такой, как F-среда [21], в некоторых системах может обеспечить лучшее поглощение ДНК, но часто вызывает массовую агрегацию протопластов и снижение выживаемости. Необходимо подобрать скорость и продолжительность центрифугирования, чтобы обеспечить осаждение протопластов с минимальными повреждениями.
- в) На этой стадии протопласты можно дважды отмыть MSP19M, определить жизнеспособность популяции, высеять клетки и культивировать как обычно (разд. 2.8). Трансформированные колонии можно отбирать, как описано в разд. 2.9, если использовались соответствующие селективные маркерные гены (например, Km^r или Nm^r). В противном случае через пару дней инкубации в культуре можно анализировать временную экспрессию ДНК, захваченной путем эндоцитоза, с помощью САТ-анализа (разд. 6.4.2), чтобы получить доказательство эффективности поглощения ДНК в присутствии ПЭГ. Обычно мы используем для поглощения плазмиды 15%-ный ПЭГ и получаем разумную активность САТ через 48 ч культивирования.
Чтобы улучшить эффективность посева протопластов после поглощения ДНК, можно разделить поврежденные и интактные протопласты с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте плотности. Для этого обычно протопласты центрифугируют в/на среде, которая имеет то же осмотическое давление, что и раствор для поглощения ДНК, но большую плотность. Например, протопласты, отмытые в растворе, содержащем 13% (вес на объем) маннитола, можно ресуспендировать в растворе, содержащем 21% (вес на объем) сахарозы, без осмотического шока. При центрифугировании (400 об/мин, 10 мин) интактные протопласты будут флотировать, образуя компактную зону на поверхности раствора, тогда как более плотный дебрис будет осаждаться. Аналогичным образом можно использовать градиенты перколлы или фиколла. Альтернатива заключается в осаждении через плотную сахарозную подушку, которая удерживает менее плотные протопласты на своей поверхности.
- г) После обработки ПЭГ протопласты находятся «в стрессовом состоянии», и необходимо обеспечить их восстановление путем культивирования в течение нескольких дней при высокой плотности посева (10^5 жизнеспособных протопластов в 1 мл), часто в присутствии фидерных культур необработанных протопластов. Следует регулярно следить за формированием клеточной стенки и поддерживать плотность клеток на уровне около 5×10^4 в 1 мл до наступления первого деления. Селекцию трансформантов можно осуществлять, как описано в разд. 2.9.3 (совместное культивирование клеток с агробактериями).
- д) Обработка растворами ПЭГ 6000 может оказаться слишком жесткой для более хрупких систем протопластов. В этом случае целесообразно использовать ПЭГ с меньшей массой, но для достижения трансфекции могут понадобиться более высокие концентрации.
- е) Для сравнительной оценки поглощения вектора важно экстрагировать равные количества интактных протопластов из каждого образца. Если вам не удалось выделить достаточно протопластов, то соответственно скорректируйте результаты.
- ж) Возможные проблемы, возникающие при выделении ДНК из клеток с помощью метода, в котором используется СТАВ, детально описаны в разд. 4.2.3. Раствор 3XСТАВ-буфера очень вязок, и если его не добавлять к суспензии протопластов быстро и не перемешивать тщательно, то возможно образование комков вместо лизиса протопластов. Комки протопластов легко заметить, тогда как полностью лизированный препарат

прозрачен. Агрегаты дебриса протопластов будут связывать много ДНК, в том числе и интернализированную векторную плазмиду, и, таким образом, при гибридизации ДНК сигнал будет занижен. Это следует учитывать при рассмотрении результатов.

- а) На этом этапе ДНК можно хранить в виде осадка под 100%-ным этанолом и высушить под вакуумом на более поздней стадии перед анализом с помощью дот-блоттинг-гибридизации. Целостность векторной ДНК после эндоцитоза можно проверить и с помощью блоттинг-гибридизации по Саузерну (гл. 5), чтобы убедиться в целостности вектора. Считается, что поглощение в присутствии ПЭГ происходит очень быстро, поэтому в среду для инкубации крайне редко включают ингибиторы нуклеаз. Основные принципы введения метки в ДНК с помощью олигонуклеотидной заправки и проблемы, связанные с гибридизацией ДНК, обсуждаются в разд. 5.5 и 5.6.
- б) Необходимо отметить, что следить за количеством и качеством доставленного внутрь клеток вектора обязательно только при разработке методики переноса гена посредством ДНК (DMGT). Наиболее важно оценить выживаемость протопластов после трансфекции и, разумеется, наблюдать за экспрессией интернализированной ДНК. Общая стратегия заключается в определении условий, которые обеспечивают эффективное поглощение недеградированной ДНК и высокую выживаемость протопластов, а затем в анализе временной экспрессии векторной ДНК в популяции протопластов через несколько дней после обработки ПЭГ. Как только экспрессия маркерных генов будет оптимизирована, появится потенциальная возможность селекции отдельных трансформированных колоний.
- в) На этом этапе фильтры можно хранить в сухом темном месте в течение нескольких недель до проведения гибридизации ДНК.

3.3. Трансформация протопластов с помощью электропорации

3.3.1. Основные положения

3.3.1.1. Основные принципы электропорации

В 1982 году Нейман с соавторами [27] показали, что частота трансформации клеток мыши экзогенной ДНК значительно увеличивается при воздействии электрических импульсов. Электропорация, как был назван этот процесс, вызывает кратковременное образование пор в плазматической мембране [45], через которые такие макромолекулы, как ДНК, перемещаются внутрь клетки. По-видимому, диаметр пор достигает не менее 30 нм, и они существуют в течение нескольких минут после импульса [29]. Напряженность поля (градиент напряжения) и длительность импульса (или время спада) — это две основные переменные величины, влияющие на проницаемость клеточных мембран при электропорации. Показано [27], что напряженность поля, необходимая для индукции электропорации, связана с диаметром клеток. Например, при размере щели между электродами 1 см для успешной трансфекции ДНК в случае

протопластов табака диаметром 40—44 мкм необходима напряженность поля $1,5 \text{ кВ/см}^2$. При этом требуется довольно высокое напряжение — 1,5 кВ.

Для характеристики электрического импульса важно задать как амплитуду (напряжение), так и постоянную спада. Постоянная спада — это время, требующееся для снижения напряжения до 5% исходной величины (рис. 3.4). Электропорирующий импульс создается при разрядке конденсатора в рабочей камере, которая в самодельных и некоторых коммерческих устройствах представляет собой два плоских металлических

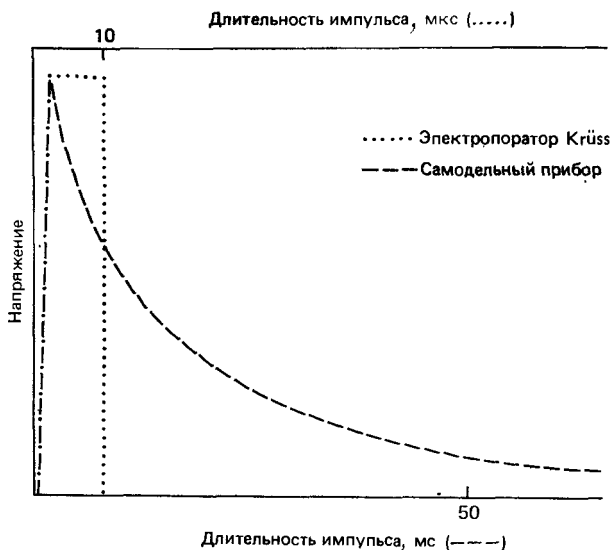


Рис. 3.4. Характеристики электрического импульса, используемого для электропорации.

электрода, помещенных в стерильную пластиковую кювету. Для электропорации протопласты суспендируют между электродами в солевом растворе. Импульс можно вывести на экран осциллографа, типичный импульс показан на рис. 3.4.

Упрощенная электрическая схема генератора импульсов для электропорации представлена на рис. 3.5. Такие приборы легко изготовить специалистам по электронике, но их использование сильно ограничено. Однако в настоящее время доступны более совершенные фирменные приборы. Например, усовершенствованный электропоратор Krüss (TA 750) способен с помощью микропроцессорного устройства задавать импульс практически прямоугольной формы с практически мгновенным спадом (рис. 3.4). Поскольку время спада не имеет большого значения

для прибора этого типа, данный параметр заменен на длительность импульса. Возможности прибора позволяют легко и точно изменять различные параметры электропорации (напряжение, длительность импульса, число импульсов и время между импульсами).

3.3.1.2. Электропорация протопластов растений

Перенос генов путем электропорации был разработан для протопластов растений, и в течение последних нескольких лет

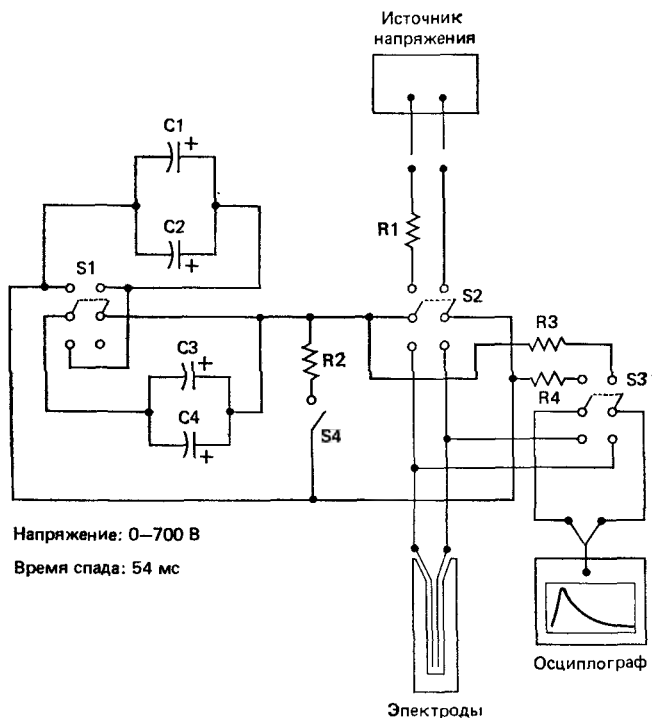


Рис. 3.5. Принципиальная схема самодельного низковольтного устройства для электропорации с экспоненциальным типом спада импульса.

появилось несколько сообщений об успешном применении данного метода [12, 13, 38]. При условии выживания протопластов после обработки электрическими импульсами число используемых клеток и проблемы, связанные с селекцией трансформированных клеток, идентичны таковым, которые возникают при трансформации протопластов с помощью ПЭГ (разд. 3.2).

Существуют в принципе два различных подхода к применению электропорации. ДНК можно успешно вводить в прото-

пласты, используя либо высоковольтный импульс малой длительности, например 1,5 кВ в течение 10 мкс [38], либо низковольтный импульс гораздо большей длительности, например 350 В в течение 54 мс [12]. Эта последняя процедура более контролируема и, возможно, в будущем найдет широкое применение.

Разработка и последующая оптимизация методики электропорации специально для трансформации протопластов растений была в основном осуществлена с помощью двух различных подходов.

1. Временная экспрессия векторной ДНК в популяции обработанных протопластов. Для этого требуется измерить активность фермента, кодируемого вектором, например САТ, в грубых лизатах протопластов, подвергшихся электропорации [12].
2. Стабильная трансформация и селекция трансформированных колоний [38]. В этом случае необходимо определение частоты стабильно трансформированных колоний, образующихся в результате различных процедур электропорации.

3.3.1.3. Временная экспрессия

Работа, проведенная Фроммом с соавторами [12], помогла определить условия, дающие максимальную экспрессию легко скринируемого продукта индикаторного гена (хлорамфениколацетилтрансферазы, САТ) после электропорации протопластов векторной ДНК, несущей этот ген (анализ данного фермента описан в разд. 6.4.2). В этих экспериментах было показано, что эффективность электропорации, которая измеряется количеством ДНК, поглощенной протопластами, можно количественно связать с активностью САТ. Поэтому оптимизация методики электропорации заключается в том, чтобы подвергать популяцию протопластов различным по напряжению, длительности и времени спада импульсам, а также использовать серии импульсов, а затем анализировать через соответствующее время активность САТ. Результаты таких экспериментов менее прямые, чем кажется на первый взгляд, поскольку увеличение напряжения и длительности импульса приводит к пропорциональному увеличению гибели клеток. В результате величина активности САТ, выявленной в популяции протопластов, недооценивает количество вектора, включенного каждой клеткой. Поэтому эффективность электропорации зависит от того, измеряют ли ее на всей исходной популяции или на тех клетках, которые остаются жизнеспособными после обработки. Фромм с соавторами [12] сообщил, что импульс длительностью 54 мс при 350 В обеспечивает максимальную активность САТ и она достигает пика через 24—48 ч после электропорации. Однако

подобные результаты, хотя и очень обнадеживающие, не дают каких-либо сведений относительно доли клеточной популяции, активно продуцирующей САТ. Более того, условия, наиболее благоприятные для временной экспрессии, не обязательно обеспечивают стабильную трансформацию. Недавно в некоторых неопубликованных работах, где 35S промотор ВМЦК соединяли с кодирующей областью β -галактозидазы, утверждалось, что возможно определение числа протопластов, в которых идет экспрессия конструкции, путем реакции с X-GAL (см. pBin19 в разд. 1.1.5). Аналогично этому Конч с соавторами [20] сообщил, что бактериальная люцифераза, которая состоит из двух различных белковых субъединиц, в протопластах растений собирается в функциональный светопродуцирующий фермент. Это позволяет количественно оценить временную экспрессию в трансфицированных протопластах путем измерения светового излучения.

3.3.1.4. Стабильная трансформация

С помощью электропорации были получены стабильно трансформированные растения или клеточные линии некоторых видов растений. К их числу относятся табак [38], морковь [22] и кукуруза [13]. Шилито с соавторами [38] использовал вектор, содержащий доминантный селективный маркерный ген (*npt-II*), который ранее успешно применяли в экспериментах по переносу генов с помощью ПЭГ [31]. Эту плазмиду вводили с помощью электропорации в протопласты табака и отбирали трансформанты на основе резистентности к канамицину. Данные исследования, очевидно, отнимают больше времени, чем эксперименты по временной экспрессии, но в конечном итоге позволяют разработать методику стабильной трансформации. В настоящее время при использовании методов электропорации частота трансформированных колоний может достигать 2%, что более эффективно, чем трансфекция ДНК с помощью ПЭГ. Пути интеграции перенесенной ДНК такие же, как и при использовании ПЭГ, и в обоих случаях перенесенные гены наследуются в соответствии с нормальными менделевскими соотношениями.

3.3.2. Оптимизация методик электропорации с помощью временной экспрессии

3.3.2.1. Основные положения

Один из подходов к определению оптимальных условий для электропорации протопластов состоит в анализе временной экспрессии гена в составе ДНК, которую вводят в клетки.

В этом отношении очень удобна конструкция *CaMV-35S-cat*. Этот химерный ген образуется при слиянии между промоторной областью 35S РНК вируса мозаики цветной капусты и кодирующей областью бактериального гена хлорамфениколацетилтрансферазы [12]. Промотор *CaMV-35S* — один из сильнейших конститутивных промоторов, идентифицированных до сих пор; он обеспечивает эффективную экспрессию связанного с ним гена в самых разнообразных растениях. Разработан удобный и чувствительный метод определения САТ как в животных, так и в растительных клетках (разд. 6.4.2). Это сочетание интенсивной экспрессии и чувствительного метода анализа объясняет столь широкое использование *CaMV-35S-cat* в векторах для временной экспрессии, таких, как небольшая плазмида *pCaMVCAT* (рис. 3.2). Независимо от исследуемого параметра электропорации, общий принцип эксперимента состоит в том, что постоянное количество протопластов обрабатывают в присутствии плазмиды, несущей ген *cat* (например, *pCaMVCAT*), культивируют в течение 24—48 ч, чтобы обеспечить экспрессию гена, и анализируют активность САТ (разд. 6.4.2). В последнее время появились различные фирменные приборы, поэтому дать обобщенное описание обращения с «электропоратором» трудно. В одних приборах используется экспоненциальный спад импульсов, в других — прямоугольные импульсы. Эти приборы можно классифицировать далее в зависимости от того, дают ли они высоко- или низковольтный импульс.

В эксперименте необходимо рассматривать следующие параметры:

- Напряжение и длительность импульса: для приборов, генерирующих прямоугольные импульсы большой амплитуды, эти параметры составляют 500—5000 В/см и 10—50 мкс [28]. Низковольтные приборы данного типа генерируют импульсы 500—1000 В/см длительностью 2—60 мс. При использовании приборов с экспоненциальным спадом более уместно говорить о времени спада импульса, чем о его длительности. Для них напряжение составляет 100—1000 В/см и импульс может длиться 5—60 мс [12, 29].
- Число и частота импульсов: при условии, что напряжение и длительность импульса оптимизированы, не представляется необходимым давать более одного импульса [28, 29].
- Среда: первоначально рекомендуется использовать среду для культивирования нормальных протопластов, прежде чем испытывать растворы, составленные специально для электропорации^{*)}.

3.3.2.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Обычные материалы для культуры тканей (приложение 2 [I]).
- Электропоратор Krüss (модель ТА 750): это многоцелевой прибор с высоковольтным прямоугольным импульсом с длительностью 8—999 мкс и максимальной амплитудой 750 В (что соответствует напряженности поля, большей чем 3000 В/см). Нижеследующие методики основаны на использовании этого прибора.
- Водяная баня на 45 °С.
- Фазово-контрастный микроскоп Nikon.
- Гемоцитометр (конструкции Фукса — Розенталя).

Растворы

- Свежевыделенные протопласты (например, клетки альбиноса *Petunia hybrida*, сорт Blue Lace, приложение 3 [I]) в концентрации 4×10^6 в 1 мл в среде для электропорации^{а)}. Комментарии к процедуре выделения протопластов см. в разд. 2.7.
- Раствор векторной ДНК (например, pCaMVCAT) в концентрации 250 мкг/мл в стерильной дистиллированной H₂O.
- Раствор ПЭГ^{д)} в культуральной среде (например, для *P. hybrida* используют 15%-ный ПЭГ 6000).
- Культуральная среда (например, для *P. hybrida* используют MSP1 9M, приложение 2 [II]);
 - агаризованная MSP1 9M с 0,8% агара (2 мл в чашках Петри диаметром 5 см, $\times 5$)
 - жидкая среда MSP1 9M (100 мл).

3.3.2.3. Методика

Примечание: соблюдайте стерильность. Работайте в ламинарном боксе, за исключением экстракции клеток для оценки временной экспрессии через 48 ч.

1. Добавляют 20 мкл^{б)} суперспирализованной^{в)} плазмиды (например, pCaMVCAT) к протопластам и осторожно перемешивают.
2. Прогревают пробирку (тепловой шок)^{г)} 5 мин на водяной бане при 45 °С. Охлаждают на льду до комнатной температуры (3—4 мин) и затем оставляют при комнатной температуре на 10 мин.

Таблица 3.2. Зависимость между импульсом при электропорации и выживаемостью протопластов

Напряжение, В/см	Длительность импульса, мкс	Выживаемость протопластов, %
0	10	90
1000	10	50
2000	10	40—45
3000	10	25—30

3. Добавляют 0,5 мл раствора ПЭГ^{д)} и осторожно перемешивают. Инкубируют при комнатной температуре 10 мин.
4. Для каждого тестируемого параметра^{е)} переносят соответствующий объем^{ж)} протопластов в камеру для электропорации и прикладывают один или более импульсов. Например, для электропоратора Krüss используют величину напряженности поля в диапазоне 500—3000 В/см и длительность импульса 10—30 мкс.
5. Переносят протопласты в чашку Петри диаметром 5 см, содержащую 2 мл агаризованной среды для культивирования.
6. Повторяют стадию 4 со следующей аликвотой протопластов и объединяют порции в одной чашке Петри для достижения необходимой плотности посева.
7. Инкубируют чашку Петри при комнатной температуре 10 мин, а затем добавляют^{з)} 10 мл жидкой среды для культивирования.
8. Оценивают выживаемость аликвоты протопластов (разд. 2.7) с помощью микроскопа. В табл. 3.2 показана зависимость между выживаемостью протопластов и напряженностью поля для электропоратора Krüss в эксперименте, схематически изображенном на рис. 3.6.
9. Инкубируют протопласты в темноте при 25 °С в течение 36—48 ч^{и)}.
10. Осаждают протопласты центрифугированием (400 об/мин). Ресуспендируют осадки в 1,0 мл жидкой среды для культивирования, переносят пробирки Эппендорф и очень быстро переосаждают (при низкой скорости).
11. Определяют активность САТ, как указано в разд. 6.4.2. На рис. 3.6 показаны результаты эксперимента, в котором в протопласты *P. hybrida* вводили рСаMVCAT путем электропорации с помощью прибора Krüss и описываемой методики. Очевидно, что напряженность 2000 В/см и длительность импульса 10 мкс обеспечивают оптимальный уровень временной экспрессии САТ при ограниченных потерях выживаемости протопластов.

Примечания

- а) Во всех опубликованных до сих пор методиках электропорации используют среду с высокой проводимостью, содержащую ионы либо Mg^{2+} [38], либо Ca^{2+} [12]. Проводимость препарата протопластов можно довести путем добавления $MgCl_2$ и измерения сопротивления (используя, например, прибор AVO B183 LCR meter, Thorp-EMI Ltd.). Сопротивления в диапазоне 1—1,2 кОм были определены как оптимальные [38]. Однако, работая с прибором типа Krüss TA 750, можно использовать и среды с низкой проводимостью, поскольку кратковременные прямоугольные импульсы напряжения эффективны в таких средах. Действительно, в экспериментах с протопластами *Petunia* сорта Blue Lace более эффективная электропорация была достигнута (в отношении активности CAT) при использовании нормальной среды для культивирования этих протопластов (MSP19M), у которой сравнительно низкая проводимость. Часто в среду для электропорации добавляют ДНК-носитель, чтобы обеспечить альтернативные субстраты для секретируемых нуклеаз, например ДНК из тимуса телянка в концентрации 40 мг/мл [38]. Однако следует отметить, что эта ДНК тоже будет встраиваться в хромосомы обработанных протопластов.

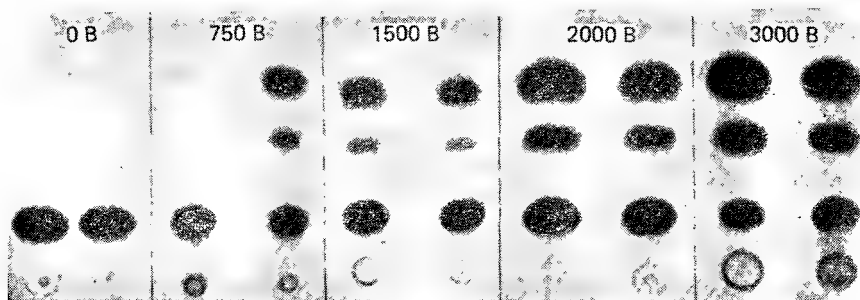


Рис. 3.6. Анализ временной экспрессии активности CAT в протопластах *Petunia hybrida* сорта Blue Lace через 48 ч после электропорации и введения рCaMVCAT. Были приложены импульсы 0, 750, 1500, 2000 и 3000 В/см длительностью 10 мкс.

- б) При этом концентрация плазмиды составляет 10 мкг/мл, что считается удовлетворительным как для стабильной трансформации [38], так и для временной экспрессии [12].
- в) Как и в случае трансфекции с помощью ПЭГ, частота трансформации, как правило, повышается, если вектор предварительно был переведен в линейную форму.
- г) Показано, что тепловой шок (5 мин при 45 °C) перед добавлением плазмиды увеличивает частоту трансформации от 5 до 20 раз [38]. Тепловой шок можно провести между 5 и 30 мин перед добавлением ДНК, не уменьшая эффективности обработки.
- д) Показано, что добавление ПЭГ после ДНК увеличивает частоту трансформации. Оптимальная концентрация ПЭГ составляет 6—15%.
- е) Предполагаемые интервалы следующие:

Тип прибора	В/см	Длительность
Высоковольтный/импульс малой длительности	500—300	10—40 мкс
Низковольтный/импульс большой длительности	100—400	5—6 мс

ж) Объем камеры разумеется зависит от типа прибора: в некоторых устройствах, особенно самодельных, используют пластиковые кюветы, в других — пластины Costar, а в некоторых — специально изготовленные камеры.

з) Здесь отсутствует этап отмывания.

и) Этого промежутка времени достаточно для экспрессии гена *cat*.

3.4. Трансформация растительных клеток путем микроинъекций

3.4.1. Основные положения

3.4.1.1. Общий подход к микроинъекции клеток

Техника микроинъекций, первоначально разработанная в 1970 г. для клеток животных независимо А. Грассманном и Е. Г. Дьякумакосом, в настоящее время стала рутинным методом для введения небольших молекул, макромолекул (ДНК, РНК, белков), органелл и вирусных частиц в самые различные животные клетки [4]. Методика основана на использовании стеклянных микропипеток с диаметром кончика 0,5—10 мкм, с помощью которых осуществляют прямой перенос макромолекул в цитоплазму или в ядро реципиентной клетки или органа. Последние иммобилизуют на твердой подложке, искусственно связывают с субстратом или закрепляют посредством пипетки с присоской [1, 17, 39].

Поскольку микроинъекция ДНК оказалась эффективным методом трансформации животных клеток, различные группы исследователей пытались разработать подобные методы для трансформации клеток растений [14, 23, 26, 41]. Однако только недавно была показана возможность трансформации растительных клеток путем прямых микроинъекций чужеродной ДНК в протопласты [5, 6, 35]. Успех этих последних экспериментов был обусловлен главным образом разработкой таких методических подходов, которые позволяют локализовать ядра и ориентировать протопласты таким образом, чтобы чужеродная ДНК могла быть введена непосредственно в ядра протопластов без заметного снижения их выживаемости. Новые приемы спо-

собствовали более успешной внутриядерной инъекции и благодаря этому воспроизводимой трансформации.

Ниже указаны преимущества и недостатки техники микроинъекций для трансформации растительных клеток.

Преимущества

- Для клеток животных сообщалось об очень высоких частотах трансформации (15—60%); и, таким образом, метод может быть полезен в тех случаях, когда доступно только небольшое количество клеток, протопластов или органов.
- Метод позволяет вводить макромолекулы в цитоплазму или ядро.
- Среднее количество инъецированных макромолекул на клетку можно оценить (приблизительно 0,1—1,0 мкл) и контролировать.
- Метод допускает наибольшую гибкость в выборе типа и размера молекул или органелл, используемых в качестве донора (например, ДНК, хромосомы, ядра, органеллы).
- Биологический эффект инъецированного материала можно оценить в природном окружении и наблюдать после инъекции.
- Методика не требует обязательного удаления клеточной стенки и, таким образом, может использоваться в случае тех видов растений, которые в настоящее время не удается регенерировать из колоний, полученных на основе протопластов. Это основная причина интереса к микроинъекциям.

Вполне вероятно, что в течение следующих нескольких лет наибольшее внимание будет приковано к микроинъекциям клеток, способных к эмбриогенезу, например клеток пыльцы, эмбриогенных суспензионных культур или изолированных семян-почек. Кроме того, мишенью могут стать клетки развивающихся зачатков побегов или эмбрионные ткани, изолированные зародыши и т. п. Однако здесь могут возникать проблемы из-за развития химерных растений.

Недостатки

- Метод относительно дорого наладить и для его воспроизведения требуется высококвалифицированный и опытный персонал. Процесс чрезвычайно медленный — квалифицированный работник способен инъецировать только 20—100 клеток за день.
- Введение микропипетки может оказывать повреждающее действие на реципиентные клетки.
- Для ядерной трансформации доставку чужеродной ДНК обычно необходимо осуществлять непосредственно в ядро реципиентной клетки. Для культивируемых животных кле-

ток, которые уплощены, прикрепляются к твердому субстрату и не имеют клеточной стенки, положение ядра в цитоплазме клетки не составляет проблемы. Это справедливо и в отношении яйцеклеток млекопитающих. При работе с растительными клетками очень трудно проколоть клеточную стенку без забивания кончика иглы. Наличие клеточной стенки и форма растительных клеток затрудняют визуализацию ядра. Если клетка иммобилизована в неправильной ориентации, то практически невозможно попасть в ядро, не разрывая вакуоль, что вызывает немедленную гибель клетки. Иммобилизация сама по себе тоже способствует некоторому повреждению протопластов.

- Для выращивания микроинъецированных клеток требуются специальные методы культивирования, например в микрокаплях или с применением фидерной культуры.

3.4.2. Трансформация растений путем микроинъекций

3.4.2.1. Основные положения

Несмотря на описанные выше проблемы в разработке методов микроинъекций для растительных клеток, особенно протопластов, достигнут большой прогресс. В ранних исследованиях проводили инъекции в цитоплазму протопластов табака при 70%-ной выживаемости [40]. В этих экспериментах использовали клетки двух-, трехдневного возраста, полученные из протопластов, которые сформировали тонкую клеточную стенку и способны прикрепляться к покровному стеклу, покрытому поли-L-лизин (рис. 3.7, А). За микроинъекцией наблюдали, вводя флуоресцентный краситель (Lucifer yellow). Однако игла микроинъектора редко попадала в ядро из-за того, что при использовании этого метода иммобилизации протопластов/клеток трудно локализовать ядра. С тех пор сообщалось, что поли-L-лизин часто обладает токсическим действием по отношению к протопластам.

Более поздняя разработка заключается в том, чтобы заплывать протопласты в очень тонкий слой легкоплавкой агарозы в нейлоновом кольце [23]. Благодаря данному методу иммобилизации, многие протопласты находятся у поверхности агарозы и только частично окружены ею, так что их нетрудно инъецировать (рис. 3.7, Б). При этом локализация ядра — непростая задача. Преимущество метода состоит в том, что инъецируемые протопласты (клетки) уже находятся в культуральной среде, обеспечивающей поддержание их жизнеспособности. Разработан еще один метод, предусматривающий иммобилизацию протопластов с помощью специально предназначенной «удержива-

ющей пипетки» (рис. 3.7, В). Протопласт можно втянуть или освободить, прикладывая положительное или отрицательное давление к удерживающей пипетке, соединенной со шприцем. Метод допускает манипуляцию протопластами для оптимальной ориентации ядра относительно инъекционной пипетки. Как указывалось ранее, с помощью данного метода протопласты Кроссвей с соавторами [5] впервые показали возможность трансформации клеток растений путем инъекции чужеродной ДНК.

Чтобы легко визуализировать ядро иммобилизованных протопластов (клеток) для инъекции чужеродной ДНК, обычно используют инвертированный микроскоп, снабженный дифференциальной интерференционной оптикой (Nomarski). Кроме того,

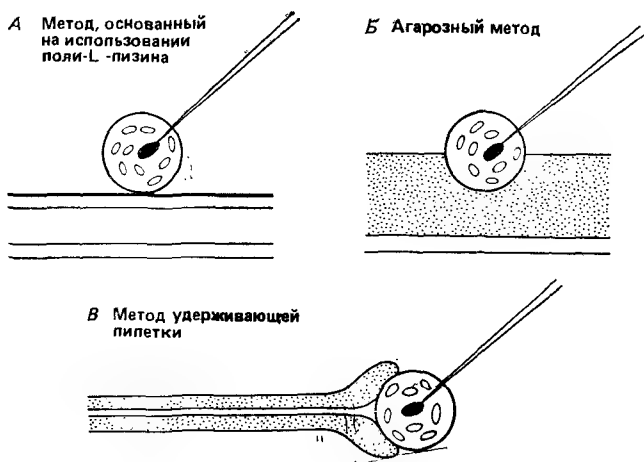
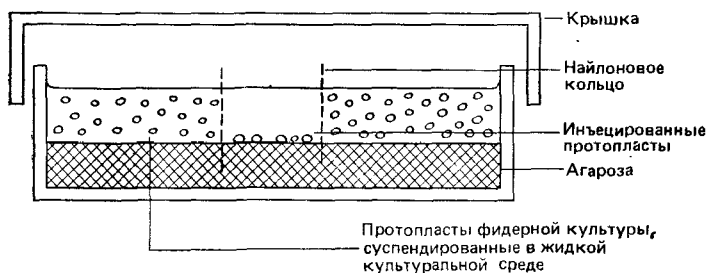


Рис. 3.7. Методы иммобилизации протопластов для микроинъекций.

во многих случаях удобно окрашивать ядра ДНК-специфичными флуоресцентными красителями, не снижающими жизнеспособность (Hoechst 33258), и визуализировать протопласты (клетки) с помощью инвертированного микроскопа, снабженного эпифлуоресцентной оптикой [35]. Микроинъекции осуществляют под объективом $\times 40$ инвертированного микроскопа тонкой микропипеткой, изготовленной с помощью «вытягивателя пипеток». Микропипетку сначала заполняют раствором для инъекций, а затем направляют в иммобилизованный протопласт/клетку, используя «микроманипулятор». После введения микропипетки в ядро соответствующий объем инъецируемого раствора переносится в него путем вдувания или под давлением с помощью шприца, соединенного одним концом с микропипеткой, а другим — с системой регуляции давления.

Если клетки иммобилизованы на предметном стекле или в агарозе, то ядра обычно инокулируют после того, как клеткам дали время восстановиться, обычно в конце первого дня после прикрепления или заплывания. Очень удобно иммобилизовать клетки на специальной микроскопической пластинке с нанесенной сеткой. Это позволяет локализовать отдельные клетки в любое время до или после инъекции с помощью видеозаписи. Таким образом можно следить за их развитием и предпринять соответствующие действия, чтобы обеспечить их рост в культуре. Если используются удерживающие пипетки, то протопласты следует выделять из жидкой культуры на стадии, когда они компетентны для трансформации (разд. 2.9.3), проводить инъ-

А Метод, предусматривающий использование нейлоновой марли



Б Висячие микрокапли

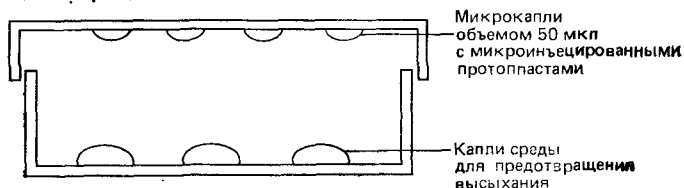


Рис. 3.8. Фидерная культура и культивирование микроинъецированных протопластов в висячей капле.

екции и затем культивировать в таких условиях, чтобы их можно было идентифицировать. В большинстве случаев инокулированные протопласты культивируют в виде отдельных клеток на фидерных культурах или в микрокаплях (рис. 3.8). Эффективность посева после инъекции обычно уменьшается на 10—70%, но если используется эффективная техника микрокультивирования, это не представляет большой проблемы, поскольку частоты трансформации очень высоки (в среднем 15—25%!). Блоттинг-гибридизация по Саузерну показала, что трансформанты, образующиеся из микроинъецированных клеток, содержат перенесенную ДНК, организованную так же, как

и при использовании других систем трансфекции. Наследование генов, введенных с помощью микроинъекций, не должно отличаться от такового при трансформации растений другим методом.

Цель данного раздела — ознакомить исследователей с некоторыми методиками микроинъекций с целью трансформации растительных клеток.

3.4.2.2. Обеспечение

Оборудование и приспособления

- Обычное оборудование для культуры тканей (приложение 2[I]).
- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1[I]).
- Микроскоп: для микроинъекций можно использовать любой инвертированный микроскоп с высоким увеличением хорошего качества (например, Nikon TMD; Leitz Diavert) с большим рабочим расстоянием конденсора, фазово-контрастной оптикой и оборудованный эпифлуоресцентной и/или дифференциальной интерференционной оптикой. Микроскоп должен быть прочно зафиксирован, и всю систему необходимо поместить на противовибрационный стол в ламинарном боксе. Для наблюдения за протопластами требуется объектив $\times 10$, а для визуализации ядер и самих инъекций — объектив $\times 40$.
- Микроманипулятор: для микроинъекций можно использовать любой микроманипулятор, который контролирует перемещения во всех трех направлениях и допускает физическое разделение держателя и блока ручного управления. Ряд коммерчески доступных микроманипуляторов обеспечивают такие возможности; Leitz производит микроманипуляторы типа джойстик, которыми можно управлять вручную либо с помощью специальных приборов. Гидравлический манипулятор Narishige MO104 или 103M и пневматический манипулятор серии De Fonbrune тоже очень удобны для микроинъекций.
- Устройство для вытягивания пипеток и микрокузница: для микроинъекций необходима тонкая микропипетка с гладким кончиком; такие микропипетки относительно легко можно изготовить с помощью коммерчески доступного устройства и микрокузницы (Leitz; Narishige, PG-1, MF-77, Fonbrune, MF-80).
- Устройство для инъекций (например, Leitz) и тефлоновая трубка.
- Печь на 130°C .

- Водяная баня на 40 °С.
- Стеклянные капилляры с внутренним диаметром 1,0—1,5 мм и наружным диаметром 1,5—2,0 мм (например, Jencops) для изготовления микропипеток.
- Стеклянные капилляры для изготовления удерживающих пипеток (например, Leitz 520—119).
- Контейнер для хранения микрокапилляров.
- Покровные стекла (22×22 мм).
- Найлоновые кольца (внутренний диаметр 10 мм, глубина 2 мм).

Растворы

- Этанол.
- Диэтиловый эфир (BDH AnalaR).
- Силиконизирующий раствор (например, Sigma, Sigmacote).
- Поли-L-лизин (Sigma, мол. масса 80 000—130 000).
- Стерильная дистиллированная H₂O.
- Протопласты (например, альбиносическая линия *Petunia hybrida*, приложение 3[1]). Используют клетки, которые культивировали в течение 1—3 дней.
- Среда для культивирования протопластов (например, MSP1 9M, приложение 2[II]):
- Жидкая среда
- Среда с 0,5 и 1,0% (вес на объем) легкоплавкой агарозы (например, Miles Scientific, Sea Plaque).

3.4.2.3. Методика

Приготовление микропипеток и заполнение их раствором для инъекций

1. Перед вытягиванием замачивают стеклянные капилляры в этаноле на 1 ч или в течение ночи, затем дают стечь остаткам спирта и высушивают при 130 °С в течение 30 мин. Для нанесения гидрофобного покрытия капилляры погружают в смесь эфира и силиконизирующего раствора (3:1), а затем прогревают 1 ч при 130 °С. До использования хранят в стерильном, сухом и закрытом контейнере.
2. Вводят и закрепляют стеклянный капилляр в устройство для вытягивания, избегая контакта с нагревающей нитью. В зависимости от того, какие микропипетки необходимы — диаметром 0,1—1 мкм для инъекций или 5—100 мкм для удержания клеток, при использовании большинства фирменных приборов следует регулировать следующие два параметра: 1) температуру нити, которая контролируется путем изменения силы протекающего через нее электрического тока, и

- 2) натяжения пружины, которое создается путем регулирования ручки натяжения.
3. Просматривают вытянутую микропипетку под микроскопом для определения диаметра кончика и общего качества.
4. Отполировывают микропипетку в пламени с помощью микроузницы^{а)}.
5. Заполняют выбранные микропипетки раствором для инъекций. Для этого опускают микропипетки в инъекционный раствор и ждут, пока он не войдет в пипетку под действием капиллярных сил, либо используют длинную трубку для заполнения капилляров, как описано в литературе [39]^{б)}.

Методы иммобилизации клеток

Для проведения микроинъекций необходима иммобилизация растительных протопластов/клеток/органелл. Можно использовать различные методы, три из них приведены ниже.

Метод, основанный на использовании поли-L-лизина [40]

1. Культивируют протопласты в соответствующей жидкой среде в течение 24 ч^{в)}, а затем используют для иммобилизации на покрытом поли-L-лизином стеклянном покровном стекле (рис. 3.7, А).
2. Стерилизуют несколько стеклянных покровных стекол, помещая их на 24 ч в абсолютный спирт, а затем тщательно ополаскивают стерильной дистиллированной водой.
3. Помещают покровные стекла на 10 мин в стерилизованный путем фильтрования 0,1%-ный раствор поли-L-лизина^{в)} (свежеприготовленный на воде).
4. Удерживая покровные стекла пинцетом, *осторожно* ополаскивают их стерильной дистиллированной водой^{г)}. Промывают покровные стекла средой для культивирования протопластов. Избегают их высыхания.
5. Помещают покровные стекла в чашки Петри диаметром 5 см. Наносят по капле суспензии протопластов (100 мкл) на покровные стекла и оставляют на 30—60 мин, чтобы протопласты прикрепились к поли-L-лизину.
6. Отмывают неприкрепившиеся протопласты культуральной средой.

Метод вплавления в агарозу [23]. Свежеизолированные протопласты иммобилизуют на твердой культуральной среде, в которую добавлена агароза.

1. Разводят протопласты жидкой средой для культивирования (2×10^4 протопластов в 1 мл).
2. Конструируют «камеру» для микроинъекций, используя стерильное покровное стекло, поверх которого располагают

стерильное нейлоновое кольцо. Помещают камеру в пластиковую чашку Петри диаметром 9 см. Практически полностью заполняют кольцо средой для культивирования протопластов, содержащей 1% легкоплавкой агарозы, и дают ей застыть^{д)}.

3. Смешивают каплю суспензии протопластов в культуральной среде при комнатной температуре с равным объемом среды для культивирования протопластов, 0,5% легкоплавкой агарозы, охлажденной до 40 °С. Для этого помещают 1 мкл культуральной среды, содержащей 0,5% легкоплавкой агарозы, в центр кольца, после этого добавляют 1 мкл протопластов в жидкой культуральной среде и дают смеси застыть в течение 10 мин. Для микроинъекций можно использовать протопласты, которые наполовину погружены в агаризованную среду (рис. 3.7, Б).

Метод удерживающей пипетки [26, 5]. Удерживающие пипетки (внутренний диаметр 5—10 мкм) вытягивают из стеклянных капиллярных трубок Leitz 520—119 и полируют в пламени на микрокузнице. Можно использовать и пипетки со сферическим кончиком (внешний диаметр 20—100 мкм) [5].

1. Соединяют удерживающую пипетку через тефлоновую трубку с микрошприцем. С помощью микрошприца можно приложить к пипетке слабое отрицательное или положительное давление, чтобы присосать или освободить протопласт.
2. Переносят протопласты, ресуспендированные в жидкой культуральной среде, в пластиковую чашку Петри диаметром 5 см, расположенную на столике микроскопа (в ламинарном боксе). Оставляют на 5 мин, чтобы протопласты осели.
3. Наблюдая в микроскоп, удерживают отдельный протопласт путем легкого присасывания и ориентируют (поочередно прикладывая и снимая давление) таким образом, чтобы ядро/цитоплазма заняли благоприятное положение для введения пипетки (рис. 3.7, В)^{е)}.

Техника микроинъекций

1. С помощью объектива $\times 10$ инвертированного микроскопа сначала локализуют подходящую клетку, иммобилизованную одним из описанных выше способов.
2. С помощью оптики Nomarski или флуоресцентного окрашивания ДНК^{е)} убеждаются, что ядро находится в таком положении, чтобы при инъекции не была повреждена вакуоль. Если клетки или протопласты вплавлены в агарозу, выбирают именно такую клетку. При использовании удерживающей пипетки пытаются переориентировать клетку в правильное положение.

3. С помощью микроманипулятора располагают заполненный микрокапилляр вблизи от выбранной клетки протопласта^ж). Находят ядро с помощью объектива ($\times 40$) и вводят микрокапилляр через ядерную мембрану^з), стараясь не повредить тонопласт.
4. Вводят известное количество раствора вектора в реципиентное ядро^и), используя устройство для инъекции, и затем выводят микроиглу.

Примечания

- а) Это единственный способ попрактиковаться в изготовлении микропипеток, определяя затем их характеристики в процессе микроинъекций.
- б) Может произойти высыхание образца на кончике, если заполненную микропипетку не поместить в культуральную среду примерно на 1—2 мин.
- в) Свежевыделенные протопласты часто погибают в результате воздействия поли-L-лизина. Некоторые концентрации поли-L-лизина (они варьируют в зависимости от вида растения) токсичны для протопластов возраста 24 ч. В каждом случае необходимо тестировать влияние различных концентраций раствора поли-L-лизина.
- г) Осторожное ополаскивание не вызывает удаления поли-L-лизина, покрывающего стекло.
- д) Агарозу перед употреблением охлаждают таким образом, что она почти застывает.
- е) Для визуализации ядра удобна дифференциальная интерференционная оптика (Nomarski).
- ж) Следует принимать предосторожности, чтобы быть уверенным, что кончик не обломился в результате втыкания в дно чашки из-за неправильных микроманипуляций или фокусирования. Появление отрицательного давления в микропипетке приведет к всасыванию жидкости из окружающей культуральной среды. В результате вместо раствора вектора произойдет инъекция питательной среды в ядро, поэтому, если возможно, следует поддерживать все время слабое положительное давление.
- з) Следует принять предосторожности, чтобы в процессе инъекции капилляр не забивался материалом клеточной стенки или цитоплазматическими компонентами. Для наблюдения за инъекцией можно использовать флуоресцентные красители, например Lucifer yellow. Часто можно наблюдать разбухание ядер.
- и) Для введения известного количества инъецируемого раствора в реципиентное ядро тонкой капиллярной трубкой требуется четкая регуляция давления внутри микропипетки. Обычно используют стеклянный или газонепроницаемый шприц на 1 мл (Hamilton), управляемый пружиной и микрометром, соединенным с микропипеткой через клапан высокого давления и тефлоновую трубку [1, 26].

Культивирование микроинъецированных протопластов

Микроинъецированные протопласты можно культивировать различными способами. Полагают, что частота трансформации среди выживших клеток довольно высока, поэтому основная проблема заключается в культивировании небольшого количества клеток для обеспечения нормального образования колоний и регенерации побегов.

Культивирование в микрокаплях. Инъецированные клетки выращивают в висячих микрокаплях в чашке Петри (рис. 3.8, Б). Инъецированные протопласты, прикрепленные к покровному стеклу с помощью поли-L-лизина или вплавленные в агарозу, осторожно удаляют, либо протопласты переносят непосредственно в микрокапли после инъекции, используя удерживающую пипетку. Плотность инъецированных клеток/протопластов в микрокаплях обычно составляет 10^4 в 1 мл культуральной среды. Объем капли, как правило, около 10—50 мкл, и, следовательно, капля должна содержать 100—500 клеток. Провести микроинъекции такого числа клеток трудно, поэтому используют фидерную культуру неинъецированных протопластов (например, протопластов суспензионной альбинотической культуры, если микроинъецировали мезофильные протопласты, или наоборот), чтобы способствовать росту инъецированных клеток. Обычно в каждую каплю помещают только 5 или 10 инъецированных клеток. Капли располагают рядами на крышке чашки Петри и для поддержания высокой влажности на основание чашки Петри наносят небольшие капли культуральной среды. При этом каждую микроинъецированную клетку некоторых видов растений можно культивировать в отдельной микрокапле, поэтому необходимость в селекции отпадает. Если используют фидерные клетки, то образуемые ими микроколонии должны заметно отличаться от инъецированных клеток. В противном случае трансформированные микроколонии необходимо селективировать с помощью стандартных методов (разд. 2.9.3). Следует подчеркнуть, что для отдельных видов растений разработка методов микрокультивирования может вызвать значительные трудности.

Культивирование на покровном стекле. Целые покровные стекла с микроинъецированными клетками можно аккуратно залить небольшим объемом культуральной среды в чашке Петри. В этом случае росту инъецированных клеток будут способствовать неинъецированные, впоследствии трансформированные микроколонии необходимо отбирать на среде, содержащей антибиотик (разд. 2.9.3). Во многих лабораториях проводят инъекцию протопластов, иммобилизованных на специальном покровном стекле с нанесенной сеткой, и следят за развитием инъецированных клеток с помощью видеозаписи.

Фидерные культуры. Для инициации клеточного деления и формирования микроколоний микроинъецированные протопласты можно выращивать на фидерной культуре. Приведем один из многочисленных методов, который успешно используется в ряде лабораторий. Фидерную культуру подготавливают, помещая

найлоновое сетчатое кольцо диаметром 8 мм (размер ячеек сетки 15—20 мкм) в центр чашки Петри диаметром 5 см (рис. 3.8, А). Затем его фиксируют путем заливки поддерживающего слоя — 2 мл среды для культивирования протопластов, содержащей 0,8% (вес на объем) агара, распределяемой как внутри, так и снаружи кольца. Затем на поверхность слоя агара наносят 2 мл среды для культивирования протопластов. Микроинъецированные протопласты помещают в центре кольца, а соответствующие фидерные клетки — вне его (рис. 3.8, А). Чашки обматывают пленкой Nescofilm и составляют в темном помещении при 26 °С.

Более подробно культивирование протопластов и селекция скрининг трансформированных колоний описаны в гл. 2.

Приложение 3 [I]

Выделение протопластов из клеток суспензионной альбиносической культуры *Petunia hybrida* (сорт Blue Lace)

1. Отбирают суспензионные культуры *Petunia hybrida* сорта Blue Lace на 4-й день после начала субкультивирования и осаждают клетки в течение 10—15 мин.
2. Удаляют всю среду стерильной пастеровской пипеткой.
3. Добавляют 40 мл раствора фермента (0,05% мацерозима и 0,2% целлюлозы в CPW 13М, приложение 2 [V]; раствор стерилизуют фильтрованием и хранят при —20 °С). Инкубируют в течение ночи на медленной качалке (80 об/мин, круговое вращение).
4. Фильтруют раствор через сетку (диаметр ячеек 64 мкм), собирая фильтрат в стерильную чашку Петри.
5. Переносят фильтрат в стерильную центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугируют 5 мин при 400 об/мин.
6. Удаляют супернатант и ресуспенсируют осадок в 10 мл CPW 13М (приложение 2 [V]).
7. Центрифугируют 5—10 мин при 400 об/мин.
8. Дважды отмывают в MSP1 9М (приложение 2 [II]) путем осаждения (400 об/мин, 5 мин).
9. Ресуспенсируют осадок в 10 мл MSP1 9М и измеряют количество протопластов с помощью гемоцитометра.

Литература

1. Anson W. (1984) Improved system for capillary microinjection into living cells. *Exp. Cell Res.* 140, 31—7.
2. Balázs E., Bouzoubaa S., Guilley H., Jonard G., Paszkowski J., Richards K. (1985) Chimaeric vector constructions for higher-plant transformation. *Gene* 40, 343—8.

3. Bevan M. W., Flavell R. B., Chilton M.-D. (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**, 184—7.
4. Celis J. E. (1984) Microinjection of somatic cells with micropipettes: Comparison with other transfer techniques. *Biochem. J.* **223**, 281—91.
5. Crossway A., Hauptli H., Houck C. M., Irvine J. M., Oakes J. V., Perani L. A. (1986) Micromanipulation techniques in plant biotechnology. *Biotechniques* **4**, 320—34.
6. Crossway A., Oakes J. V., Irvine J. M., Ward B., Knaut V. C., Shewmaker C. K. (1985) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 179—85.
7. De la Pena A., Lorz H., Schell J. (1987) Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature* **325**, 274—6.
8. Deshays A., Herrera-Estrella L., Caboche M. (1985) Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *E. coli* plasmid. *EMBO J.* **4**, 2731—7.
9. Draper J., Davey M. R., Freeman J. P. (1986) Delivery systems for the transformation of plant protoplasts. In: *Plant Cell Culture Technology*, pp. 271—301. Ed. Yeoman, M. M. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
10. Draper J., Davey M. R., Freeman J. P., Cocking E. C., Cox B. J. (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissue from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* **23**, 451—8.
11. Freeman J. P., Draper J., Davey M. R., Cocking E. C., Gartland K. M. A., Harding K., Pental D. (1984) A comparison methods for plasmid delivery into plant protoplasts. *Plant Cell Physiol.* **25**, 1353—65.
12. Fromm M. E., Taylor L. P., Walbot V. (1985) Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5824—8.
13. Fromm M. E., Taylor L. P., Walbot V. (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* **319**, 791—3.
14. Griesbach R. J. (1983) Protoplast microinjection. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 32—7.
15. Hain R., Stabel P., Czernilofsky A. P., Steinbiss H. H., Herrera-Estrella L., Schell J. (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 161—8.
16. Hain R., Steinbiss H.-H., Schell J. (1984) Fusion of *Agrobacterium* and *E. coli* spheroplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts — Direct gene transfer from microorganism to higher plant. *Plant Cell Rpts.* **3**, 60—4.
17. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexnord C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmeter R. D., Brinster R. L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* **315**, 680—3.
18. Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M., Schell J. (1983) Chimaeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* **2**, 987—95.
19. Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Sanford J. C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70—3.
20. Koncz C., Olsson O., Landridge W. H. R., Schell J., Szalay A. A. (1987) Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 131—5.
21. Krens F. A., Molendijk L., Wullems G. J., Schilperoort R. A. (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti plasmid DNA. *Nature* **296**, 72—4.
22. Landridge W. H. R., Li B. J., Szalay A. A. (1985) Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA. *Plant Cell Rpts.* **4**, 355—9.

23. Lawrence W. A., Davies R. D. (1985) A simple method for microinjection and culture of protoplasts at very low densities. *Plant Cell Rpts.* **4**, 33—5.
24. Lörz H., Baker B., Schell J. (1985) Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 179—82.
25. Mayer P., Walgenbach E., Bussman K., Hombrecher G., Saedler H. (1985) Synchronized tobacco protoplasts are efficiently transformed by DNA. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 269—76.
26. Morikawa H., Yamada Y. (1985) Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localisation of injected materials. *Plant Cell Physiol.* **26**, 229—36.
27. Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982) Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**, 841—5.
28. Nishiguchi M., Landridge W. H. R., Szalay A. A., Zaitlin M. (1986) Electroporation-mediated infection of tobacco leaf protoplasts with tobacco mosaic virus RNA and cucumber mosaic virus RNA. *Plant Cell Rpts.* **5**, 57—60.
29. Okada K., Nagata T., Takebe I. (1986a) Introduction of functional RNA into plant protoplasts by electroporation. *Plant Cell Physiol.* **27**, 619—26.
30. Okada K., Takebe I., Nagata T. (1986b) Expression and integration of genes introduced into highly synchronised plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **205**, 398—403.
31. Paszkowski J., Shillito R. D., Saul M., Mandak V., Hohn T., Hohn B., Potrykus I. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**, 2717—22.
32. Pietrzak M., Shillito R. D., Hohn T., Potrykus I. (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nuc. Acids Res.* **14**, 5857—58.
33. Potter H., Weir L., Leder P. (1984) Enhancer-dependent expression of human α immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7161—5.
34. Reich T. J., Holbrook L. A., Miki B. L. A., Iyer V. N. (1984) Development of intranuclear microinjection into plant protoplasts. *J. Cell Biochem.* **8**, 60—73.
35. Reich T. J., Iyer V. N., Miki B. L. (1986) Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmids. *Biotechnology* **4**, 1001—4.
36. Riggs C. D., Bates G. W. (1986) Stable transformation of tobacco by electroporation. Evidence of plasmid concatation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5602—6.
37. Sanders P. R., Winter J. A., Barnason A. R., Rogers S. G., Fraley R. T. (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1543—9.
38. Shillito R. D., Saul M. W., Paszkowski J., Muller M., Potrykus I. (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotechnology* **3**, 1099—103.
39. Stacey D. W. (1981) Microinjection of mRNA and other macromolecules into living cells. *Methods in Enzymol.* **79**, 76—88.
40. Steinbiss H. H., Stable P. (1983) Protoplast derived tobacco cells can survive capillary microinjection of the fluorescent dye Lucifer Yellow. *Protoplasma* **116**, 223—7.
41. Steinbiss H. H., Stable P., Topfer R., Hirtz R. D., Schell J. (1985) Transformation of plant cells by microinjection of DNA. In: *Proc. 1984 Wye Int. Sym. Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, pp. 64—75. Eds. Chapman G. P., Mantell S. H., Daniels R. W. Longman, London.
42. Uchimiya H., Fushimi T., Hashimoto H., Harada H., Syono K., Sugawara Y. (1986a) Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* **204**, 204—7.

43. Uchimiya H., Hirochika H., Hashimoto H., Hara A., Masuda T., Kasumimoto T., Harada H., Ikeda J. E., Yoshioka M. (1986b) Co-expression and inheritance of foreign genes in transformants obtained by direct DNA transformation of tobacco protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 205, 1—8.
44. Van den Elzen P. J. M., Townsend J., Lee K. Y., Bedbrook J. R. (1985) A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 5, 299—302.
45. Zimmerman U., Scheurich P., Pilwat G., Benz R. (1981) Cells with manipulated functions. New perspectives for cell biology, medicine, and technology. *Angewandte Chemie International (edition in English)* 20, 325—44.

Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений

Дж. Дрейпер, Р. Скотт

4.1. Введение

Препараты нуклеиновых кислот необходимы для идентификации и выделения генов в процессе генно-инженерных манипуляций, а также для изучения организации и экспрессии генов на молекулярном уровне в трансформированных растениях. В первом случае высокомолекулярная очищенная ДНК и интактная РНК необходимы для получения соответственно геномных библиотек и библиотек ДНК. Подробно методики клонирования генов и их анализа описаны в других пособиях [1, 8]. После того как изучаемый ген клонирован и его структура установлена, его можно ввести в растения (в неизменном или модифицированном виде) с помощью векторов типа DMGT или векторов, сконструированных на основе Ti-плазмид (гл. 1, 2 и 3).

Кроме клонирования и конструирования генов методы выделения нуклеиновых кислот и их анализа служат составной частью многих процедур, используемых для определения структуры и экспрессии трансфицируемых генов как в культурах трансформированных клеток растений, так и в целых регенерированных растениях.

4.1.1. Выделение ДНК

В некоторых случаях для тестирования последовательностей чужеродного гена в трансформированной ткани можно использовать метод дот-блоттинг-гибридизации ДНК. Изучение организации чужеродной ДНК, встроенной в геном растения, лучше всего начинать с блоттинг-гибридизации по Саузерну (гл. 5 и разд. 6.2). Данный метод позволяет определить копийность встроенных последовательностей ДНК, выяснить, расположены ли эти многочисленные вставки tandemно либо рассеяны по геному, а также оценить стабильность этой ДНК в поколении F₁ трансформированных растений. Весьма важно получить как можно больше данных о строении и расположении перенесенных генов в геноме трансформированного растения, поскольку от этого в значительной степени может зависеть их экспрессия и наследуемость. Для подробного анализа организации чужеродной и окружающей ее ДНК требуются такие методы выде-

ления ДНК, которые позволяют получить хорошо очищенные препараты с достаточно длинными молекулами, что необходимо для клонирования генов. Если для трансформации используют векторы, полученные на основе агробактерий, важно выделять ДНК из стерильной ткани, поскольку загрязнение ДНК *A. tumefaciens* может повлиять на интерпретацию результатов.

Существенный фактор при выполнении ДНК из растительных клеток — эффективное разрушение клеточных стенок. К сожалению, многие методы, используемые для этого, приводят к фрагментации ДНК, и, следовательно, в каждой конкретной ситуации достигается определенный компромисс между размером ДНК и ее выходом. Эту трудность можно частично преодолеть при использовании лиофилизированного материала (разд. 4.2). Однако высвобождение высокомолекулярной ДНК — это только часть задачи, поскольку экстракты растительных клеток содержат большие количества полисахаридов, таннинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК. Хуже того, некоторые полисахаридоподобные примеси невозможно определить обычными аналитическими методами, не приводящими к разрушению ДНК. Такие примеси препятствуют правильному определению количества нуклеиновых кислот спектрофотометрическими методами и дают аномальную кинетику гибридизации. Кроме того, что гораздо важнее, они могут подавлять активность большинства ферментов, модифицирующих ДНК, в том числе и ферментов рестрикции. Это может затруднять как анализ ДНК методом блоттинг-гибридизации по Саузерну, так и ее клонирование.

Клетки растений обычно разрушают в водных растворах в присутствии хелатирующих агентов, подавляющих нуклеазную активность, и детергентов, которые растворяют мембраны. После разрушения клеток белки денатурируют и осаждают из экстракта, для чего часто используют фенол либо смесь хлороформа с октанолом. Некоторые методики для освобождения ДНК от белков хроматина предусматривают использование протениназы (разд. 4.2.3.2). После депротеинизации раствор ДНК все еще сильно загрязнен РНК и углеводами и, следовательно, обычно подлежит дальнейшей очистке, техника которой в определенной степени зависит как от количества использованной для выделения ткани, так и от целей эксперимента.

Если требуется большое количество чистой ДНК, грубые экстракты ДНК могут быть очищены дифференциальным центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия, содержащего бромистый этидий (БЭ) (приложение 4 [II]). Затем для удаления солей ДНК подвергают диализу, осаждают из раствора и концентрируют с помощью этанола. На этой стадии удаляются и многие низкомолекулярные примеси. ДНК, очи-

щенная в градиенте плотности, практически не содержит примесей РНК, и ее концентрацию в растворе можно определить спектрофотометрически.

Кроме того, микрометоды (разд. 4.2.3.1 и 4.3.3.2) выделения тотальной ДНК из трансформированных клеток растений позволяют получить предварительные данные о ее организации. Для таких методов требуется всего лишь 20 мг лиофилизированной либо 0,5 г свежей растительной ткани, а очистка в градиенте плотности CsCl/БЭ не применяется. Выделенная ДНК имеет достаточно большую мол. массу, однако сильно загрязнена РНК и в меньшей степени полисахаридами. Концентрацию нуклеиновой кислоты в таких неочищенных препаратах невозможно определить спектрофотометрически, однако содержание ДНК может быть определено достаточно точно очень чувствительным методом с использованием дифениламина (разд. 4.6).

Известны различные методы выделения ДНК из большинства органов некоторых видов растений. В отдельных экспериментах по трансформации может понадобиться анализ геномной ДНК (как ядерной, так и ДНК органелл) для выявления перенесенных последовательностей. В данной главе описаны методы выделения как небольших количеств нуклеиновых кислот, так и процедуры их крупномасштабного выделения. Эти методики нашли широкое применение для получения тотальной клеточной ДНК, а также ДНК из ядер и органелл.

4.1.2. Выделение РНК

Обычно для изучения транскрипции перенесенных генов выделяют РНК, и содержание в препаратах специфических транскриптов определяют путем гибридизации с соответствующими мечеными пробами (клонированными кДНК или ядерными генами) методом дот-блоттинг-гибридизации (разд. 6.3). Метод нозерн-блоттинга (приложение 6[1]) можно использовать для получения более подробной информации о размерах определенного транскрипта.

Основная задача при выделении РНК — максимальное извлечение чистой нуклеиновой кислоты при минимальной деградации. Методы выделения основаны главным образом на подавлении рибонуклеазной активности и эффективном разрушении комплексов РНК-белок. Опубликованы многочисленные методы выделения РНК из различных растительных материалов; при этом используют следующие реагенты:

- Фенол для денатурации белка.
- Концентрированные растворы солей (например, 4М гуанидинхлорид) для одновременного растворения РНК и осаждения денатурированных белков.

— Растворы протеиназ для разрушения белковых компонентов комплекса РНК-белок.

Чаще всего используют фенол. В данной главе приведены две методики, успешно применяемые для выделения нуклеиновых кислот из разнообразного растительного материала. Выделенная с их помощью тотальная РНК обычно содержит лишь 2—3% мРНК, остальную часть в препаратах составляют тРНК и рРНК. За некоторыми исключениями, продукты транскрипции большинства генов содержатся в зрелой *poly A*⁺-фракции мРНК (см. описание структуры мРНК в разд. 6.2.2). В некоторых случаях достаточно выделения и анализа тотальной РНК. Получение *poly A*⁺-мРНК (разд. 4.8) необходимо для синтеза кДНК и проведения всех экспериментов, требующих высокой чувствительности.

В этой главе описаны некоторые основные методы выделения ДНК и РНК из разнообразных растительных тканей. Данные методики использовались ранее, однако необходимо подчеркнуть, что при работе с определенным растительным материалом они могут потребовать некоторых изменений, и их следует рассматривать лишь как общее руководство.

4.2. Выделение тотальной ДНК из лиофилизированных тканей растений

4.2.1. Общие положения

Лиофилизация весьма удобна для хранения растительного материала перед выделением ДНК. В течение некоторого промежутка времени можно высушивать и накапливать образцы растительного материала для последующего одновременного выделения нуклеиновых кислот. Лиофилизированный растительный материал можно хранить в течение нескольких лет, причем качество получаемых из него препаратов ДНК со временем снижается незначительно. Высушенную ткань легко разрушить размалыванием или растиранием. Лиофилизация позволяет сохранить целостность ДНК, поскольку обезвоженная нуклеиновая кислота в меньшей степени подвержена распаду, а нуклеазная деградация сведена к минимуму, так как гидратация происходит в присутствии хелатирующих веществ и детергентов, подавляющих нуклеазную активность.

Один из широко используемых методов [9] основан на том, что при высоких концентрациях солей (0,7 М NaCl) нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы с детергентом цетилтриэтиламмоний бромидом (СТАВ, от англ. *cetyl triethylammonium bromide*). Снижение

концентрации соли ниже 0,4 М NaCl приводит к тому, что комплекс СТАВ/нуклеиновая кислота выпадает в осадок, причем большая часть полисахаридов остается в растворе. Осадок СТАВ/нуклеиновая кислота вновь растворяют в концентрированном растворе соли (например, 1М NaCl). На этой стадии можно выбрать один из двух путей дальнейшего проведения эксперимента: 1) в неочищенном экстракте нуклеиновых кислот определить содержание ДНК и затем использовать его непосредственно для анализа методом блоттинг-гибридизации по Саузерну либо 2) очистить ДНК в градиенте плотности CsCl/БЭ.

1. Из тотального препарата нуклеиновых кислот СТАВ удаляют путем осаждения этанолом (СТАВ растворим в этаноле, а нуклеиновые кислоты нет). Промытый осадок нуклеиновых кислот растворяют в соответствующем буфере или дистиллированной воде. Перед дальнейшей работой проводят реакцию с дифениламином и определяют концентрацию ДНК (разд. 4.6). ДНК в таких неочищенных препаратах обычно полностью рестриктирована, и, следовательно, данный метод применим главным образом для быстрого анализа организации генов в трансформированных тканях методом блоттинг-гибридизации по Саузерну. В связи с тем, что средний размер ДНК в таких препаратах составляет около 25—50 т. п. н., метод мало пригоден для клонирования крупных фрагментов геномной ДНК. Примеси РНК, как правило, не препятствуют проведению анализа, однако при необходимости их можно удалить РНКазой.

2. Если требуются более чистые препараты ДНК, то раствор нуклеиновой кислоты после повторного растворения можно очистить в градиенте плотности CsCl/БЭ (приложение 4[II]).

В разд. 4.2.3.1 приведен метод выделения небольших количеств ДНК из лиофилизированных тканей, а процедура крупномасштабного выделения описана в приложении 4[I]. Лишь при выделении ДНК из некоторых лиофилизированных тканей (например, листьев злаков) метод, основанный на использовании СТАВ, оказался не совсем удачным. В разд. 4.2.3.2 приведен другой метод, основанный на обработке содержимого клеток, разрушенных протеиназой в присутствии детергента (додецилсульфата натрия, ДСН), и последующем концентрировании ДНК путем осаждения спиртом. При этом обработка нуклеиновых кислот более мягкая, на всех стадиях удается избежать их чрезмерной деградации, и, таким образом, полученные препараты ДНК обладают довольно большой мол. массой (>100 т. п. н.), что вполне подходит для клонирования генома.

4.2.2. Выделение небольших количеств ДНК с помощью СТАВ-буфера

4.2.2.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Пестики и ступки (диаметром 9 см).
- Окись алюминия (Sigma, тип 305).
- Одноразовые пластмассовые мешалки (Sarstedt).
- Водяная баня на 56 °C со штативом для микроцентрифужных пробирок.
- Настольная центрифуга MSE Centaur 2 с бакет-ротором (или аналогичная).
- Стерильные силиконизированные центрифужные пробирки из пирекса (16×25 мм) с завинчивающимися крышками (Corning) или полипропиленовые пробирки (например, Sarstedt, тип 60.540 (65×95 мм)).
- Штатив для центрифужных пробирок.
- Вытяжной шкаф.
- Стекланный стакан для слива отходов (500 мл).
- Одноразовый респиратор (Robinson and Son, тип 68 000).

Растворы

- Однократный СТАВ-буфер для экстракции [50 mM трис-HCl, pH 8,0; 0,7 M NaCl; 10 mM ЭДТА; 1%-ный СТАВ (вес на объем), 20 mM 2-меркаптоэтанол]. На 100 мл:

2,0 M трис-HCl, pH 8,0	2,5 мл
5,0 M NaCl	14,0 мл
0,5 M ЭДТА	2,0 мл
СТАВ (Sigma H-5882)	1,0 г
2-Меркаптоэтанол (2-МЭ)	140,0 мкл

Раствор вначале следует приготовить без 2-МЭ, избегая пенообразования, на подогреваемой мешалке, затем его автоклавируют и хранят при температуре выше 15 °C. Непосредственно перед использованием добавляют соответствующую аликвоту 2-МЭ. В случае приготовления двух- и трехкратных СТАВ-буферов для экстракции необходимы соответственно в два или три раза большие концентрации составляющих компонентов.

- Однократный СТАВ-буфер для осаждения [50 mM трис-HCl, pH 8,0; 10 mM ЭДТА, 1%-ный (вес на объем) СТАВ]. На 100 мл:

2,0 M трис-HCl, pH 8,0	2,5 мл
0,5 M ЭДТА	2,0 мл

СТАВ

1,0 г

Готовят так же, как и СТАВ-буфер для экстракции.

— 10%-ный СТАВ [10% (вес на объем) СТАВ, 0,7 М NaCl].

На 100 мл:

СТАВ 10,0 г

5,0 NaCl 14,0 мл

Примечание: все автоклавированные растворы, содержащие СТАВ, стабильны при комнатной температуре ($>15^{\circ}\text{C}$) в течение нескольких месяцев.

— 1 М NaCl (стерильный).

— Стерильная дистиллированная вода.

— Смесь хлороформ/октанол (24:1) в обычном стеклянном флаконе.

— Растворы спирта (100-, 85- и 65%-ный спирт).

4.2.2.2. Методика

1. Взвешивают 0,1 г лиофилизированного каллуса или 0,07 г лиофилизированных листьев с удаленными главными жилками^{а)}. Надев респиратор, растирают ткань с 0,3 г окиси алюминия в небольшой ступке с пестиком (диаметром 9 см) ^{б), в)}.
2. Помещают растертую в порошок растительную ткань в пробирку Эппендорф. Добавляют 600 мкл однократного СТАВ-буфера для экстракции^{г)} и осторожно размешивают порошок пластмассовой мешалкой^{з)}. Инкубируют 10—20 мин при 56°C . Время от времени необходимо постукивать по дну пробирки, чтобы перемешивание проходило интенсивнее^{е)}.
3. Добавляют 600 мкл смеси хлороформ/октанол (24:1)^{ж), з)} и эмульгируют встряхиванием. Центрифугируют 2 мин в микроцентрифуге и переносят водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку Эппендорф.
4. Промывают интерфазу, образованную денатурированным белком, в исходной пробирке 100 мкл однократного СТАВ-буфера для экстракции. Вновь центрифугируют, удаляют водную фазу и соединяют ее с первой.
5. Добавляют 0,1 объема 10%-ного СТАВ^{ж)} (70 мкл) к собранной водной фазе и перемешивают. Повторяют экстракцию смесью хлороформ/октанол.
6. Стараясь не захватить клеточный дебрис, переносят водную фазу в силиконированную^{и)} центрифужную пробирку из пирекса (например, Corning размером 16×125 мм) либо в устойчивую к хлороформу ^{з)} пластмассовую пробирку (например, полипропиленовую фирмы Sarstedt размером 16×95 мм). Добавляют равный объем СТАВ-буфера для осаждения^{г)} (600 мкл), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин^{к)}.

7. Осаждают центрифугированием^{а)} в настольной центрифуге с бакет-ротором (2000 g, 15 мин). Удаляют супернатант и высушивают осадок. Если осаждения не происходит, центрифугируют при больших скоростях в силиконированных пробирках из корекса (10 мин, 8000 g, 20 °С) в центрифуге типа Sorval^{м), н)}.
8. Вновь растворяют осадок нуклеиновая кислота — СТАВ в 400 мкл NaCl, при необходимости нагревая его до 56 °С. Переносят раствор в стерильную пробирку Эппендорф.
9. После окончательного растворения осадка^{б)} добавляют два объема (800 мкл) этанола, перемешивают и оставляют при —70 °С (сухой лед/этанол) на 30 мин либо на ночь при —20 °С.
10. Осаждают выпавшие в осадок нуклеиновые кислоты в микроцентрифуге (2 мин) и промывают 1 мл 65%-ного этанола в течение 1 мин. Сливают этанол и промывают осадок еще два раза^{в)}. Аналогичным образом промывают осадок 85%-ным этанолом. Если в какой-нибудь момент осадок взмутится, осаждают его в микроцентрифуге.
11. Высушивают осадок в вакуумном эксикаторе^{р)} и вновь растворяют^{р)} нуклеиновые кислоты в 85 мкл стерильной дистиллированной воды. Хранят при —20 °С.
12. Определяют концентрацию ДНК^{с)} путем реакции с дифениламином (разд. 4.6).

Примечания

- а) Если исследователь располагает большим количеством лиофилизированной ткани, целесообразно растереть ее и взвесить столько, сколько нужно для выделения ДНК, учитывая вес добавленной окиси алюминия.
- б) Эффективное разрушение клеточной стенки, вероятно, представляет собой ключевой фактор успешного выделения ДНК, и в связи с этим необходимо следить за тем, чтобы растирание проводилось тщательно. Респиратор необходим для предотвращения вдыхания окиси алюминия, что может иметь вредные последствия. Особенно важно удалить все водянистые ткани, которые затрудняют растирание и в любом случае содержат мало ДНК. Механическая гомогенизация, например, в кофемолке не столь эффективна, как в ступке, однако может применяться в самом начале процедуры растирания. Можно проконтролировать степень разрушения растительной ткани путем насыщения образцов водой и исследования их под микроскопом для выявления неразрушенных клеток. Неразрушенные ядра на любой стадии выделения удается выявить, окрашивая препараты акридиновым оранжевым (приложение 2 [VII], Б).
- в) Метод, основанный на использовании СТАВ-буфера можно применять и в работе со свежим растительным материалом (разд. 4.3.2.2), а также для выделения ДНК из органелл (разд. 4.4.1.3).
- р) СТАВ выпадает в осадок при температуре ниже 15 °С, поэтому буферы на его основе следует хранить в теплом помещении. Типичная ошибка — помещение пробирок, содержащих СТАВ-экстракты, в холодный ротор либо в предварительно охлажденную центрифугу.

- «д» Иногда после добавления СТАВ-буфера для экстракции к растертому растительному материалу полученная суспензия отличается большой вязкостью. Это зависит от источника ткани, содержания в ней полисахаридов и т. д. Для удовлетворительной экстракции рекомендуется разводить растертую ткань дополнительными аликвотами СТАВ-буфера, а затем соответственно увеличить объемы растворов, используемых на последующих стадиях.
- «е» Во время инкубации при 56 °С окись алюминия начинает быстро оседать и может увлечь за собой растительный материал. Поэтому важно время от времени перемешивать экстракты, чтобы все мембраны растворились в СТАВ-буфере.
- «ж» Смесь хлороформ/октанол используют для денатурации и осаждения белков. Октанол добавляют для улучшения «смачивающих» свойств хлороформа, а также в качестве поверхностно-активного вещества для предотвращения вспенивания СТАВ. Вместо октанола можно использовать изоамиловый спирт, это зависит от того, какой запах вам более неприятен! После экстракции органическими растворителями и центрифугирования водная фаза должна быть прозрачной. В противном случае необходимо центрифугировать либо в течение большего промежутка времени, либо при больших скоростях. СТАВ растворим в хлороформе, поэтому для поддержания требуемой концентрации добавляют 10%-ный СТАВ. (10%-ный СТАВ очень вязкий, и перед использованием его рекомендуется нагреть до 56 °С).
- «з» Важно отметить, что хлороформ растворяет многие пластмассы, и поэтому экстракцию следует проводить в пробирках из полиалломера, полипропилена либо пирекса. Настоятельно не рекомендуется использовать пробирки из поликарбоната и полиэтилена. Кроме того, у хлороформа невысокая точка кипения. Следовательно, перед добавлением хлороформа экстракты необходимо охладить до комнатной температуры, а после их встряхивания следует осторожно выпустить пар, скопившийся в пробирках. Два последних условия особенно важны при выделении больших количеств ДНК. Поскольку пары как хлороформа, так и октанола оказывают раздражающее воздействие, выделение ДНК, как правило, проводят под тягой. Эти две жидкости, а также растворы этанола обычно растворяют чернила фломастера, следовательно, необходимо следить за тем, чтобы надписи не смывались.
- «и» Готовые силиконирующие растворы, такие, как «Сигмакот» (Sigma), можно использовать для предотвращения адсорбции и, следовательно, возможных потерь ДНК, а также предотвращения прилипания осадка к стенкам пробирки и облегчения сбора небольших объемов водных растворов в больших центрифужных пробирках. Завинчивающиеся крышки с тефлоновыми прокладками тоже предотвращают потери нуклеиновых кислот, которые могут произойти при перемешивании.
- «к» После добавления СТАВ-буфера для осаждения нуклеиновые кислоты можно оставить для формирования осадка на более длительное время, даже на ночь, если поддерживается температура выше 20 °С. Необходимо убедиться, что СТАВ-буфер для осаждения хорошо перемешан. В связи с тем что в нем не содержится соли, этот буфер оказывается легче гораздо более плотного СТАВ-буфера для экстракции. При добавлении буфера для осаждения иногда образуются осадки комплексов нуклеиновой кислота/СТАВ не совсем белого цвета. В некоторых случаях они волокнистые либо может постепенно образовываться мелкодисперсный осадок. Следует обратить внимание, какой осадок образуется при осаждении нуклеиновых кислот из каждого образца, и определить, обусловлен ли данный тип осадка низким выходом либо чрезмерным загрязнением. Если осадок не образуется, возможно, что клетки содержат значительные количества солей, и для снижения их концентрации можно дополнительно добавить СТАВ-буфер для осаждения. Если нуклеиновые кислоты по-

прежнему не выпадают, можно попытаться осадить их добавлением 2,5 объемов холодного (-70°C) этанола. Однако при этом могут выпасть в осадок и загрязняющие препараты полисахариды.

- *) Весьма важно избегать осаждения нуклеиновых кислот СТАВ-буфером при слишком большом ускорении, поскольку очень плотные осадки могут плохо растворяться. Во избежание этого следует использовать настольную низкоскоростную центрифугу с бакет-ротором. При работе с небольшим количеством материала, как правило, нуклеиновые кислоты вполне успешно осаждаются в мини-центрифуге и впоследствии ресуспендируются, если работать осторожно. Осадок СТАВ/нуклеиновая кислота весьма стабилен, и стадию осаждения целесообразно проводить в течение ночи.
- *) После осаждения осадок должен быть чисто белого цвета, коричневые полифенолы и большая часть полисахаридов остаются в растворе. Если этого не происходит, то после растворения осадка препарат нуклеиновых кислот следует обработать фенолом для удаления примесей (разд. 5.2, примечание б).
- *) Если необходим чистый препарат, особенно при выделении ДНК с помощью СТАВ-буфера в большом масштабе (приложение 4 [I]), то на этой стадии ДНК может быть очищена в градиенте CsCl/БЭ, как описано в приложении 4 [II].
- *) Перед осаждением этанолом необходимо убедиться в полном растворении осадка. СТАВ обычно растворяется весьма быстро, однако прозрачный осадок нуклеиновых кислот может не раствориться и всплыть со дна пробирки.
- *) Этанол осаждает нуклеиновые кислоты, а промывание растворами этанола способствует удалению остатков СТАВ из препаратов нуклеиновых кислот, что необходимо для обработки рестриктазами.
- *) Требуется лишь непродолжительная сушка в эксикаторе. Некоторые препараты ДНК могут растворяться в течение 1—2 ч, и поэтому следует убедиться, что осадок полностью растворился, прежде чем определять концентрацию ДНК или проводить любой другой анализ. *Необходимо отметить, что раствор содержит РНК, главным образом рРНК.* Если раствор слишком вязок, возможно вследствие большого количества рРНК¹ или полисахаридов, его можно дополнительно разбавить. РНК, содержащаяся в образце, обычно не влияет на обработку рестриктазами и часто выходит из геля при электрофорезе. Если необходимо, РНК можно удалить РНКазой А (разд. 4.2.3.2, стадии 10—13).
- *) Данный метод в зависимости от типа ткани дает выход от 50 до 200 мкг ДНК на 0,1 г лиофилизированного материала.

4.2.3. Выделение ДНК с помощью протеиназы

4.2.3.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Пестики и ступки (12—15 см в диаметре).
- Окись алюминия (Sigma, тип 305).
- Одноразовый респиратор.
- Центрифуга Sorval RC-5B (либо аналогичная) с ротором 8×50 мл.

¹ Растворы РНК не имеют повышенной вязкости даже при очень высокой концентрации. — *Прим. ред. пер.*

- Центрифужные пробирки (например, «Налджин», тип 3119, Oak Ridge объемом 38 мл, полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой).
- Водяная баня на 37°C со штативом для центрифужных пробирок.
- Пастеровские пипетки с широким кончиком.

Растворы

- 10 мг/мл протеиназы К (Sigma, Р-0390 в дистиллированной H₂O).
- Буфер для протеиназы (100 мМ трис-HCl, рН 8,5; 100 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА, рН 8,0; 2%-ный ДСН; 0,1 мг/мл протеиназы К). *На 100 мл:*

2,0 М трис-HCl, рН 8,5	5,0 мл
5,0 М NaCl	2,0 мл
0,5 М ЭДТА, рН 8,0	10,0 мл
ДСН	2,0 г
- 10,0 мг/мл протеиназы К (добавляют перед употреблением) 1,0 мл
- ТЭ-буфер (10 мМ трис-HCl, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА). *На 100 мл:*

2,0 М трис-HCl, рН 8,0	0,5 мл
0,5 М ЭДТА	0,2 мл
- 10 мг/мл РНКазы А (Sigma, R-4875) в стерильной дистиллированной H₂O. Прогревают (5 мин, 100°C), разливают на порции и хранят при -20°C.
- 3 М ацетата натрия (рН 5,6). *На 100 мл:* растворяют 24,6 г в 50 мл дистиллированной H₂O, доводят рН до 5,6 ледяной уксусной кислотой и доливают до 100 мл дистиллированной H₂O.
- Фенол (подвергнутый перегонке): насыщают фенол, содержащий 0,1% 8-гидроксихинолина (BDH Analar) ТЭ-буфером (рН 8,0). Хранят в темноте при 4°C не более 6 нед.
- Смесь хлороформ/изоамиловый спирт (24:1); насланяют на эту смесь ТЭ-буфер, рН 8,0. Хранят под тягой.
- Изопропанол.
- 100%-ный этанол.
- 70%-ный этанол.

4.2.3.2. Методика

1. Быстро замораживают в жидком азоте^{а)} и лиофилизируют 5 г свежего каллуса, молодых листьев или другой ткани^{б)}. Хранят в запаянных пластмассовых коробках или пластиковых пакетах в присутствии осушителя (силикагеля) при -20°C.

2. Помещают лиофилизированную ткань в ступку среднего размера (диаметром 12—15 см), осторожно разламывают большие кусочки пестиком, добавляют 0,5 г окиси алюминия, а затем толкут в мелкий порошок. Добавляют 40 мл буфера для протеиназы и осторожно и тщательно перемешивают.
3. Переносят смесь в две полиалломерные пробирки объемом 38 мл с завинчивающимися крышками. Инкубируют при 37 °С в течение 1—2 ч; время от времени для перемешивания экстрактов следует переворачивать пробирки.
4. Добавляют в каждую пробирку по 8 мл фенола, уравновешенного ТЭ-буфером, и по 8 мл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1); переворачивая пробирки, перемешивают содержимое до образования эмульсии.

Примечание: если для клонирования необходима высокомолекулярная ДНК (>100 т. п. н.), смесь фенол/ДНК на этой и последующей стадиях перемешивают очень осторожно, чтобы свести к минимуму деградацию ДНК.

5. Для разделения фаз центрифугируют (5000 об/мин, 4 °С, 10 мин) в центрифуге Sorval RC-5B (или аналогичной). Стараясь не захватить клеточный дебрис, переносят водную фазу (верхний слой) в чистые центрифужные пробирки и повторяют экстракцию смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт.
6. Используя пипетку с широким концом, переносят водную фазу в новые центрифужные пробирки^{в)}, добавляют 0,6 объема изопропанола, перемешивают, переворачивая пробирки, и оставляют на ночь при —20 °С, чтобы нуклеиновые кислоты выпали в осадок.
7. Собирают осадок нуклеиновых кислот центрифугированием (4 °С, 8000 об/мин, 10 мин)^{г)} и сливают супернатант.
8. Дважды промывают осадок 10 мл 70%-ного этанола, сливают спирт и высушивают в эксикаторе.
9. Вновь растворяют осадок в 5 мл ТЭ-буфера^{д)} и хранят при —20 °С.

Примечание: если необходимо освободить осадок от РНК, проводят стадии 10—13.

10. Добавляют 7 мкл исходного раствора РНКазы (прогретой) и затем инкубируют при 37 °С 1 ч.
11. Добавляют 2,5 мл фенола, затем 2,5 мл смеси хлороформ/изоамиловый спирт и осторожно эмульгируют. Разделяют фазы, как на стадии 5, и повторяют экстракцию, используя лишь 5 мл хлороформа.
12. Добавляют 0,1 объема 3 М ацетата натрия и 2,5 объема этанола, осаждают в течение ночи при —20 °С.
13. Собирают осадок и заново растворяют в 1,5—2,0 мл ТЭ-буфера, как на стадиях 7—9. Хранят при —20 °С.

14. Определяют содержание ДНК в образце с помощью регистрирующего спектрофотометра при длинах волн между 200 и 300 нм. ДНК должна давать четко различимый пик поглощения при 260 нм ($1,0 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ мкг/мл}$). Чистые растворы ДНК должны быть прозрачными, а отношение $\text{OD}_{260} : \text{OD}_{280}$ составлять около 1,8.

Примечания

- а) Для некоторых типов растительного материала целесообразно растереть ткань в жидком азоте.
- б) Для уменьшения содержания углеводов за несколько дней (2—3 дня) до сбора растения можно поместить в темноту.
- в) Если раствор очень вязкий, то для уменьшения механической деградации ДНК, его можно слегка разбавить ТЭ-буфером.
- г) Кроме того, можно наматывать осаждающиеся нити ДНК на чистую стерильную или одноразовую пластмассовую палочку. Промыть ДНК в избытке 70%-ного этанола для удаления солей и органических веществ и высушить в вакууме.
- д) Некоторые препараты нуклеиновых кислот могут растворяться медленно (от двух часов до двух дней). Нагревание может ускорить процесс, однако лучше проводить растворение при 4 °С.

4.3. Выделение ДНК из свежего растительного материала

4.3.1. Общие положения

Выделение ДНК из некоторых лиофилизированных тканей, например содержащих многочисленные вторично утолщенные клетки и сосуды, может быть затруднено. В отдельных случаях для выделения нуклеиновых кислот из свежего материала можно использовать СТАВ-метод (разд. 4.3.2), однако для других тканей могут потребоваться иные методики. Большинство из них тоже основано на использовании детергента, вызывающего быструю денатурацию белков (при этом инактивируются и нуклеазы) и растворение мембран. Один из таких методов, впервые разработанный Деллапорта с сотрудниками [4], изложен в разд. 4.3.3. При 0 °С примеси белка и полисахаридов в экстрактах образуют комплексы с додецилацетатом калия и выпадают в осадок, а нуклеиновые кислоты остаются в растворе. Препараты ДНК, полученные с помощью данного метода, могут использоваться для лигирования. Микрометод, основанный на применении ДНС и протеиназы К, представлен в разд. 4.3.4.

4.3.2. Выделение больших количеств тотальной ДНК из свежего растительного материала с помощью СТАВ-буфера

4.3.2.1. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

Те же, что в разд. 4.2.2.1, кроме того:

- 70%-ный этанол.
- Жидкий азот.
- Большая ступка и пестик (12—15 см в диаметре).
- Центрифуга Sorval RC-5B (либо аналогичная) с ротором 8×50 мл.
- Полиалломерные пробирки объемом 38 мл с завинчивающимися крышками («Налджин», тип 3119).
- Водяная баня на 95°C со штативом для центрифужных пробирок объемом 38 мл.

4.3.2.2. Методика

1. Быстро промывают растительный материал 70%-ным этанолом и ополаскивают дистиллированной водой. Быстро замораживают 10 г ткани в жидком азоте.
2. Переносят замороженную ткань в предварительно охлажденную ступку и разламывают пестиком на кусочки. Добавляют 4 г окиси алюминия и быстро растирают ткань в мелкий порошок до того, как она оттает.
3. Переносят гомогенат в центрифужную пробирку объемом 38 мл и добавляют 0,2 мл 2-МЭ и затем 10 мл (или больше, если требуется) двукратного СТАВ-буфера для экстракции, предварительно нагретого до 95°C. Немедленно перемешивают пластмассовой палочкой и затем инкубируют в пробирке с крышкой на водяной бане при 56°C в течение 20 мин.
4. Далее следуют методике, предусматривающей использование лиофилизированного растительного материала, начиная со стадии 4 приложения 4 [1].

4.3.3. Выделение ДНК из свежих тканей с помощью ДСН

4.3.3.1. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Пестик и ступки (диаметром 9 см).
- Окись алюминия (Sigma, тип 305).
- Жидкий азот.

- Одноразовые пластмассовые палочки для размешивания (Sarstedt).
- Центрифуга Sorval RC-5B с ротором 8×50 мл (либо аналогичная).
- Полиалломерные центрифужные пробирки объемом 38 мл («Надджин», тип 3119).
- Водяная баня на 65 °С со штативом для центрифужных пробирок объемом 38 мл.
- Маленькие силиконированные фильтровальные воронки из пирекса.
- Полипропиленовое волокно (Supa Aquatic Supplies Ltd.)

Растворы

- Буфер для экстракции ДНК (100 мМ трис-НСl, рН 8,0; 50 мМ ЭДТА, рН 8,0; 500 мМ NaCl, 10 мМ 2-МЭ). *На 100 мл:*

2,0 М трис-НСl, рН 8,0	5,0 мл
0,5 М ЭДТА, рН 8,0	10,0 мл
5,0 М NaCl	10,0 мл
2-МЭ	70,0 мкл
- Буфер трис-ЭДТА (50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 10 мМ ЭДТА, рН 8,0). *На 100 мл:*

2,0 М трис, рН 8,0	2,5 мл
0,5 М ЭДТА, рН 8,0	2,0 мл.
- 10%-ный (вес на объем) ДСН в дистиллированной Н₂О.
- 5 М ацетат калия. *На 100 мл:* 49,1 г в дистиллированной Н₂О.
- 3 М ацетат натрия (рН 5,2). *На 100 мл:* растворяют 24,6 г (BDH Analaг) в 70 мл дистиллированной Н₂О, доводят рН до 5,2 ледяной уксусной кислотой и доливают до 100 мл дистиллированной Н₂О.
- Изопропанол (—20 °С).
- 80%-ный этанол.
- Стерильная Н₂О.

4.3.3.3. Методика

1. Собирают 1 г молодых листьев, замораживают в жидком азоте и переносят в предварительно охлажденную (жидким азотом) ступку диаметром 9 см. Добавляют небольшое количество окиси алюминия и растирают в очень мелкий порошок^{а)}, пока ткань не оттаяла.
2. Переносят порошок в центрифужные полиалломерные пробирки объемом 38 мл, добавляют 15 мл буфера для экстракции ДНК и размешивают замороженную ткань пластмассовой мешалкой^{б)}.

3. Когда будет получена гомогенная суспензия, добавляют 2 мл 10%-ного ДСН, тщательно перемешивают, энергично встряхивают и затем инкубируют в пробирках на водяной бане при 65°C в течение 12 мин, время от времени переворачивая пробирки^{в)}.
4. Добавляют 5 мл 5 М ацетата калия и перемешивают, несколько раз переворачивая пробирку, чтобы тяжелый раствор соли не задерживался на дне пробирки. Инкубируют на льду в течение 30 мин.
5. Собирают образовавшийся осадок белок-ДСН^{г)} в течение 30 мин при 12000 об/мин (4°C). Сливают супернатант через силиконизированную фильтровальную воронку из пирекса, заполненную полипропиленовым волокном, в чистую пробирку и добавляют 15 мл холодного (-20°C) изопропанола. Тщательно перемешивают и затем инкубируют 30 мин при -20°C.
6. Осаждают нуклеиновые кислоты центрифугированием в течение 20 мин при 8000 об/мин (4°C). Сливают супернатант и слегка подсушивают осадок, перевернув пробирку в штативе на фильтровальную бумагу.
7. Осторожно растворяют нуклеиновые кислоты в 700 мкл ТЭ-буфера, переносят в пробирку Эппендорф и центрифугируют в мини-центрифуге в течение 5 мин для удаления нерастворимых примесей.
8. Переносят супернатант в новую пробирку Эппендорф и добавляют 75 мкл 3 М ацетата натрия. Добавляют 500 мкл холодного (-20°C) изопропанола, тщательно перемешивают и наблюдают образование нитевидного осадка нуклеиновых кислот. Если этого не происходит, помещают раствор на 10 мин в смесь сухой лед — этанол.
9. Осаждают нуклеиновые кислоты в течение 30 с в настольной центрифуге и осторожно сливают супернатант.
10. Промывают осадок 80%-ным этанолом (дважды по 1 мл), высушивают в эксикаторе и растворяют в 80 мкл стерильной дистиллированной воды^{д)}.
11. Определяют концентрацию ДНК^{е)} в реакции с дифениламином (разд. 4.6). Если концентрация ДНК не существенна, то обычно для обнаружения одной копии гена на одной дорожке методом блоттинг-гибридизации по Саузерну (разд. 6.2) достаточно около 7—10 мкл препарата нуклеиновых кислот, обработанного рестриктазами^{ж)}. Как и в случае мини-препаратов (т. е. небольших количеств) ДНК, полученных СТАВ-методом, важно, чтобы рестриктазы были добавлены в избытке и инкубация продолжалась 3—4 ч^{з)}.

Примечания

- а) См. примечание б разд. 4.2.2.
- б) Для эффективной экстракции ДНК очень важно тщательно измельчить ткань. Деллапорта с сотрудниками [4] предлагает проводить быстрое измельчение в гомогенизаторе Polytron (типа гомогенизатора Уорринга) при положении регулятора скорости 2—3. Тем не менее, как правило, достаточно короткого перемешивания или короткого импульса на встряхивателе (5×3 с) при условии, что перед экстракцией ткань была тщательно растерта в порошок в ступке с пестиком.
- в) В оттаявшем экстракте ДСН может выпасть в осадок. Необходимо контролировать, чтобы во время инкубации при 65 °С ДСН полностью растворился, а экстракт был хорошо перемешан.
- г) При высокой концентрации ионов калия (>1 М) формируются нерастворимые комплексы додецилсульфата калия с белками и полисахаридами. Эти комплексы часто образуют хлопья и удаляются центрифугированием при относительно высоких скоростях и фильтрованием через полиалломерное волокно. Осадок должен быть чисто-белого цвета, компактный и волокнистый. Иногда целесообразно позволить ДНК набухнуть при 4 °С в течение 1—2 ч, время от времени постукивая по дну пробирки. Перед лигированием или рестрикцией необходимо убедиться, что препарат нуклеиновой кислоты полностью растворился.
- д) Выход ДНК из листьев многих злаков составляет 40—120 мкг на 1 г свежего веса.
- ж) См. примечание р разд. 4.2.2.
- з) Если предварительно обработать неочищенный препарат нуклеиновых кислот прогретой РНКазой, то большинство рестриктаз можно добавлять в меньшем количестве. Такие препараты ДНК могут использоваться и для лигирования.

4.3.4. Выделение ДНК из свежих тканей с помощью ДСН и протеиназы К

4.3.4.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

Те же, что и в разд. 4.2.3.1

Растворы

— Буфер S (100 мМ трис-НСl, рН 8,5; 100 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА; 2%-ный ДСН).

На 100 мл:

2 М трис-НСl, рН 8,5	5,0 мл
5 М NaCl	2,0 мл
0,5 М ЭДТА, рН 8,0	10,0 мл
25%-ный ДСН	8,0 мл

— 10 мг/мл протеиназы К (например, Sigma, P-0390).

— Буфер для экстракции: этот буфер следует готовить непосредственно перед использованием, добавив в буфер S протеиназу К до конечной концентрации 0,1 мг/мл.

— Смесь фенол/хлороформ (разд. 4.2.3.1).

- Хлороформ.
- Изопропанол.
- 70%-ный этанол.
- ТЭ-буфер (разд. 4.2.3.1).
- 2,5 М K_2PO_4 , pH 8,0. На 100 мл: готовят исходные растворы А и В.
 - А 2,5 М K_2HPO_4 (56,06 г/100 мл)
 - В 2,5 М KH_2PO_4 (34,02 г/100 мл)
- Смешивают 94,7 мл раствора А с 5,3 мл раствора В.
- 2-Метоксиэтанол (BDH Analar).
- 10 мг/мл предварительно прогретой РНКазы (разд. 4.2.3.1).
- 3 М ацетат натрия, pH 5,2 (разд. 4.2.3.1).

4.3.4.2. Методика

1. Собирают свежую ткань, разрезают или размалывают на мелкие кусочки и замораживают в жидком азоте.
2. Растирают по 0,75 г каждого замороженного в жидком азоте образца в маленькой ступке с пестиком. Переносят замороженный порошок в другую ступку с пестиком, добавляют 750 мкл буфера для экстракции и тщательно перемешивают.
3. Переносят гомогенат в пробирку Эппендорф на 1,75 мл и инкубируют при 37°C в течение 90 мин.
4. Добавляют 750 мкл смеси фенол/хлороформ и эмульгируют перемешиванием.
5. Разделяют фазы центрифугированием в течение 10 мин в мини-центрифуге. Переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку Эппендорф.
6. Добавляют 450 мкл изопропанола, перемешивают, переворачивая пробирку, и центрифугируют в течение 30 с.
7. Промывают осадок в 70%-ном этаноле и растворяют в 150 мкл ТЭ-буфера.
8. При необходимости удаляют избыток углеводов, осаждая их метоксиэтанолом^{а)}.
9. Добавляют 1 мкл предварительно прогретого исходного раствора РНКазы и затем инкубируют 1 ч при 37°C.
10. Повторяют экстракцию, добавляя 200 мкл смеси фенол/хлороформ.
11. Экстрагируют водную фазу, добавляя 200 мкл хлороформа.
12. Смешивают с водной фазой 30 мкл 3 М ацетата натрия. Добавляют 1 мл этанола, предварительно охлажденного до -20°C, и осторожно перемешивают раствор, переворачивая пробирку, чтобы осадить ДНК.
13. Осаждают ДНК центрифугированием в течение 2 мин, промывают осадок 70%-ным этанолом, высушивают в эксикаторе и растворяют в 50 мкл дистиллированной H_2O .

14. Определяют концентрацию ДНК в реакции с дифениламином (разд. 1.6).

Примечание

- а) Углеводы можно удалить с помощью метоксиэтанола следующим образом:
- 1) Добавляют 150 мкл 2,5 М K_2HPO_4 (pH 8,0) и перемешивают. Добавляют 150 мкл 2-метоксиэтанола, тщательно перемешивают и центрифугируют при 12 000 об/мин в течение 10 мин.
 - 2) Переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку и добавляют 2,5 объема этанола, охлажденного до $-20^\circ C$.
 - 3) Центрифугируют при 12 000 об/мин в течение 10 мин.
 - 4) Оттесняют осадок ДНК на одну сторону пробирки и удаляют со дна весь избыток влаги.
 - 5) Промывают ДНК 70%-ным этанолом, высушивают в эксикаторе и растворяют в 150 мкл ТЭ-буфера.

4.4. Выделение ядерной ДНК

Разработаны методы выделения ядерной ДНК из каллуса, листьев, протопластов и отдельных клеток. В каждой лаборатории используют определенные варианты методик, которые обычно подразумевают разрушение свежего растительного материала, удаление неразрушенной ткани фильтрованием, фракционирование клеточных компонентов дифференциальным центрифугированием, обратотку ядер ДНКазой, лизис, депротенинизацию и последующую очистку нуклеиновых кислот в градиенте плотности $CsCl/B\bar{E}$ [6, 16]. В данном разделе изложены методики, которые можно взять за основу при разработке способов выделения ядерной ДНК из различного растительного материала. Кроме того, ядра, выделенные, как указано ниже, могут использоваться в экспериментах по транскрипции *in vitro* для количественной оценки экспрессии определенных генов [7, 15] или с другими целями.

4.4.1. Выделение ядерной ДНК из свежих каллусов или листьев

4.4.1.1. Общие положения

В приведенной ниже методике для стабилизации ядер и предотвращения их разрыва используют сахарозу. Однако во многих лабораториях в качестве альтернативной среды для экстракции применяют гексиленгликоль [16]. Соответствующая методика представлена в разд. 4.4.2. Предлагаемый метод разработан для свежих листьев *Nicotiana tabacum*. При работе с определенным растительным материалом иногда необходимо подобрать соответствующую интенсивность и продолжительность гомогенизации. Аналогичным образом для более эффективной очистки ядер

от хлоропластов, возможно, придется модифицировать стадию 6. В ходе выделения целесообразно контролировать чистоту препаратов ядер под микроскопом, окрашивая аликвоты акридиновым оранжевым (приложение 2 [VII], В).

4.4.1.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Гомогенизатор «Политрон» (Gallenkamp).
- Стекланный гомогенизатор Поттера (Jencons).
- Высокоскоростная центрифуга с охлаждением (например, Sorval RC-5B) с роторами большого объема (4×250 мл) и бакет-ротором (4×50 мл).
- Силиконированные и автоклавированные пробирки из корекса (Corning).
- Стерильные центрифужные флаконы из полипропилена объемом 250 мл.
- Стерильные кусочки бязи (20×20 см) и нетканого материала Miracloth (Calobiochem) для фильтрования.
- Бритвы.
- Пластмассовые чашки Петри диаметром 14 см (Sterilin).
- Автоклавированный и прокаленный стакан из пирекса объемом 1 л.

Растворы

- Буфер для выделения ядер (1 М сахараза; 10 мМ трис-HCl, pH 7,2; 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ 2-МЭ). На 100 мл:

Сахароза	34,2 г
2,0 М трис-HCl, pH 7,2	0,5 мл
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1 г

 Автоклавируют и добавляют 14 мкл 2-МЭ непосредственно перед использованием.
- Буфер для промывания ядер идентичен буферу для выделения, но дополнительно содержит 0,5% Тритон X-100.
- 2,0 М HEPES (разд. 5.6.2).
- 1,0 М дитиотриэтол (ДТТ). Растворяют 3,09 г ДТТ в 20,0 мл дистиллированной H_2O . Стерилизуют фильтрованием. Ни в коем случае не автоклавируют ни ДТТ, ни содержащие его растворы.
- Буфер для хранения ядер (250 мМ сахараза; 20 мМ HEPES, pH 7,8; 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ДТТ, 50%-ный глицерин). На 100 мл:

Сахароза	8,55 г
----------	--------

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| 2,0 М НЕРЕС, рН 7,8 | 1,0 мл |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0,1 г |
| 1,0 М ДТТ | 0,1 мл |
| Глицерин | 50,0 мл |
- Буфер для лизиса (10 мМ трис-НСl, рН 7,2; 10 мМ ЭДТА; 0,5%-ный Тритон X-100). *На 100 мл:*

2,0 М трис-НСl, рН 7,2	0,5 мл
0,5 М ЭДТА	2,0 мл
Тритон X-100	0,5 мл
 - Двукратный СТАВ-буфер для экстракции [100 мМ трис-НСl, рН 8,0; 0,7 М NaCl, 20 мМ ЭДТА; 2%-ный (вес на объем) СТАВ]. См. состав СТАВ-буферов в разд. 4.2.2.1.
 - 80- и 30%-ные растворы перкола (Pharmacia) в буфере для выделения ядер.
 - 2-МЭ (Sigma).
 - Диэтиловый эфир (BDH Analar).

4.4.1.3. Методика

1. Взвешивают 200 г^{а)} молодых листьев и помещают их в стаканы из пирекса объемом 1 л. Работая под тягой, заливают листья холодным (2°C) диэтиловым эфиром^{б)} и перемешивают в течение 1—2 мин. Сливают эфир и промывают листья холодной (2°C) дистиллированной Н₂О. Последующие стадии проводят на льду, желательно в холодной комнате.
2. Удаляют средние жилки (при использовании листьев) и нарезают ткань бритвой на маленькие кусочки. Это удобно делать в чашке Петри диаметром 14 см. В случае каллуса целесообразно использовать 100—150 г ткани^{в)}.
3. Гомогенизируют растительный материал в 400 мл буфера для выделения ядер^{г)}, используя гомогенизатор «Политрон» на средней скорости (3) в течение 1—2 мин. Если среда начнет пениться, необходимо приостановить гомогенизацию. Ткань можно гомогенизировать и в предварительно охлажденном смесителе Уоринга при средней скорости 2×5 с.
4. Фильтруют гомогенат через четыре слоя стерильной бязи и один слой Miracloth (либо капрона) в стерильный стакан объемом 1 л.
5. Переносят гомогенат в стерильные центрифужные стаканы большого объема и собирают неочищенный осадок ядер центрифугированием при 500 g (10 мин, 4°C).
6. Ресуспандируют осадки в 25 мл буфера для промывания ядер, используя гомогенизатор Поттера, и осаждают ядра в силиконированных стерильных пробирках из корекса в бакет-ротаторе при 500 g (10 мин, 4°C). Продолжают промывание (3—4 раза) до тех пор, пока ядра не освободятся от клеточного

дебриса. Если требуются сверхчистые препараты, ядра можно наслаивать на ступенчатый градиент плотности перкола [16]^{г), д)}.

7. Ресуспендируют ядра на ледяной бане в 5 мл буфера для лизиса и разрушают их в течение 5 мин, встряхивая 10 раз по 5 с. Перед каждым встряхиванием гомогенат следует охлаждать на льду^{е)}.
8. Добавляют 0,1 мл 2-МЭ и 5 мл двукратного СТАВ-буфера для экстракции, предварительно прогретого до 95 °С, и быстро перемешивают пластмассовой палочкой. Далее следуют приложению 4 [I] (выделение больших количеств ДНК, стадия 4 и далее).

Примечания

- а) Методика может быть модифицирована в зависимости от количества имеющегося в распоряжении растительного материала. Изложенная выше методика рассчитана на стандартный ротор объемом 4×250 мл.
- б) Диэтиловый эфир способствует растворению восковидной кутикулы и разрушению клеток. Для более эффективного разрушения клеток можно обрабатывать каллус или клеточную суспензию растворами целлюлазы.
- в) Можно использовать и другой буфер для выделения ядер на основе гексилэнгликола (разд. 4.4.2.2).
- г) Ресуспендируют ядра в 7 мл буфера для выделения и наслаивают на ступенчатый градиент плотности перкола, приготовленный из 7 мл 35%-ного перкола и 7 мл 80%-ного перкола, растворенного в буфере А для выделения ядер в стерильных силиконированных пробирках из корекса. Центрифугируют в бакет-роторе при 8000 g в течение 30 мин при 4 °С. Между двумя слоями будут располагаться ядра, свободные от клеточного дебриса, что контролируют с помощью окрашивания акридиновым оранжевым (приложение 2 [VII], В). Эту зону отбирают и разводят 25 мл буфера для выделения ядер. Ядра осаждают и еще раз промывают тем же буфером (1000 g, бакет-ротор).
- ж) Очищенные ядра можно суспендировать в буфере для хранения и хранить при -70 °С.
- з) В некоторых случаях выделению ДНК способствует процедура оттаивания-замораживания ядерного осадка, а также обработка лизированных ядер протеиназой в течение 30 мин при 37 °С в 5 мл буфера для лизиса. Последний содержит 500 мкг/мл предварительно проинкубированной проназы (37 °С; 2 ч).

4.4.2. Выделение ядерной ДНК из протопластов

4.4.2.1. Общие положения

Высококачественные транскрипционно активные ядра в большинстве случаев можно выделять путем мягкого лизиса протопластов растений в гипертоничных буферах [16]. Однако данный метод применим лишь к тем видам растений, из которых может быть получено достаточное количество протопластов. Та-

кие ядра идеально подходят для выделения ДНК, а также для синтеза мРНК при изучении экспрессии генов *in vitro* («run-off»-транскрипция) [7, 15].

4.4.2.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Материалы для выделения протопластов из мезофилла листа (разд. 2.7) или суспензионной культуры (приложение 3 [I]).
- Материалы для выделения ядерной ДНК, см. разд. 4.4.1.2.
- Одноразовые пластмассовые пастеровские пипетки.

Растворы

- Тритон X-100.
- Буфер для выделения ядер из протопластов (100 мМ глицин, 1%-ный гексиленгликоль, 2%-ная сахароза). На 100 мл:

Глицин	0,75 г
Гексиленгликоль	1,00 г
Сахароза	2,00 г

Доводят pH до 8,5 насыщенным раствором $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

4.4.2.3. Методика

1. Выделяют протопласты, как описано в разд. 2.7 или в приложении 3 [I].
2. Суспендируют протопласты в буфере для выделения ядер^{a)} при 4 °C (на 10^6 протопластов берут 1 мл буфера). Переносят суспензию в силиконированные пробирки из корекса объемом 30 мл.
3. При постоянном перемешивании добавляют по каплям Тритон X-100 до конечной концентрации 0,1% и инкубируют 10 мин на льду, перемешивая суспензию одноразовой пастеровской пипеткой, что способствует мягкому лизису протопластов.
4. Проверяют под микроскопом, все ли протопласты разрушились, затем осаждают ядра центрифугированием в течение 10 мин при 200 g (4 °C).
5. Далее следуют методике, изложенной в разд. 4.4.1.3, начиная со стадии 6, соответственно уменьшая все объемы.

4.5. Выделение ДНК из хлоропластов и митохондрий

4.5.1. Общие положения

Методы, используемые для выделения ДНК из органелл, весьма сходны с методами выделения ядерной ДНК. Как правило, используют следующие процедуры: осаждение более тяжелых

ядер после разрушения клеток, центрифугирование при средних скоростях для осаждения хлоропластов и последующее высокоскоростное центрифугирование того же самого экстракта для получения осадка митохондрий. После промывания и обработки ДНКазой из осадков органелл выделяют ДНК (методы практически аналогичны тем, которые используют для выделения ядерной ДНК). Метод выделения хлоропластов приведен и в разд. 6.2.2.

4.5.2. Обеспечение

Материалы, перечисленные в разд. 4.4.1.2, и, кроме того:

Оборудование и расходуемые материалы

- Ультрацентрифуга с бакет-ротором (Beckman SW27 или Sorval AH627).
- Центрифужные пробирки для бакет-ротора (если возможно, прозрачные).
- Два силиконизированных стакана из пирекса.
- Одноразовые пластмассовые пипетки.

Растворы

- Буфер для выделения органелл [300 мМ сорбитол; 50 мМ трис-НСl, pH 8,0; 5 мМ ЭДТА; 0,1%-ный БСА; 0,1%-ный (объем на объем) 2-МЭ]. На 100 мл:

Сорбитол	5,6 г
2,0 М трис-НСl, pH 8,0	2,5 мл
0,5 М ЭДТА	1,0 мл
БСА (Sigma A-4503)	0,1 г
2-МЭ	0,1 мл.

Раствор готовят и автоклавируют без БСА и 2-МЭ, которые добавляют непосредственно перед использованием.

- Буфер с ДНКазой представляет собой буфер для выделения органелл, содержащий 13 мМ $MgCl_2$. На 100 мл:

Все компоненты буфера для выделения органел (см. выше)

1,0 М $MgCl_2$ 1,3 мл

ДНКазу I (Pharmacia 27-0512-01) добавляют до концентрации 250 мкг/мл непосредственно перед использованием

- Буфер для промывания органелл (150 мМ NaCl; 50 мМ трис-НСl, pH 8,0; 25 мМ ЭДТА, pH 8,0). На 100 мл:

5 М NaCl	3,0 мл
2 М трис-НСl, pH 8,0	2,5 мл
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	5,0 мл

- Буфер для лизиса (50 мМ трис-НСl, pH 7,2; 20 мМ ЭДТА). На 100 мл:

2,0 М трис-НСl, pH 7,2	2,5 мл
------------------------	--------

- состоит из трех слоев охлажденной до 4°C 1,6, 1,2 и 0,6 М сахарозы в 50 мМ трис-НСI (рН 8,0), 20 мМ ЭДТА и 0,1% БСА. Объем каждого слоя — 8 мл. Часто проще всего сначала приготовить раствор 0,6 М сахарозы и затем последовательно подслаивать под него более концентрированные растворы.
- б) Осторожно наслаивают суспензию митохондрий на каждый градиент и центрифугируют в течение 1 ч при 25 000 об/мин и 4°C.
 - в) Нижняя зона, на границе 1,6 и 1,2 М сахарозы, окрашенная в кремовый цвет, содержит большую часть интактных митохондрий. Эту зону следует отобрать пипеткой или шприцем, стараясь захватить как можно меньший объем, и поместить в силиконизированный стакан из пирекса объемом 250 мл.
 7. В течение нескольких минут постепенно разводят (чтобы избежать осмотического шока) фракцию органелл тремя объемами охлажденного до 4°C буфера для выделения органелл. Переносят препараты хлоропластов и митохондрий в разные пробирки объемом 38 мл и осаждают органеллы соответственно при 2000 и 10 000 g в течение 15 мин при 4°C.
 8. Промывают осадок органелл, ресуспендируя и осаждая его в 25 мл буфера для промывания.
 9. Вновь суспендируют каждый осадок в 5 мл буфера для лизиса^{д)} и затем на льду, постоянно покачивая, по каплям добавляют 20%-ный раствор саркозила до конечной концентрации 1%^{е)}.
 10. Из лизированных органелл ДНК можно выделить в градиенте плотности CsCl/БЭ, как описано в приложении 4 [II]^{ж)}. Другие методики выделения ДНК из очищенных органелл некоторых видов растений описаны в литературе [5, 10].

Примечания

- а) Перед выделением хлоропластов целесообразно выдерживать растения (1—4 дня) в темноте для снижения содержания крахмала. Хэнсон с сотрудниками [5] в качестве удобного источника для выделения митохондрий рекомендует использовать клетки суспензионной культуры.
- б) Размельчение определенных типов волокнистых тканей (например, листьев злаков) в гомогенизаторе Уоринга часто приводит к выжиманию сока без разрушения многих клеток. Волокнистый материал из таких экстрактов можно удалить фильтрованием через марлю, а оставшиеся интактными клетками гомогенизировать в гомогенизаторе «Политрон».
- в) Обработка загрязненных осадков органелл ДНКазой I несомненно способствует более полной очистке хлоропластной и митохондриальной ДНК от примесей ядерной ДНК и позволяет получать препараты с большей мол. массой. Однако процедуру обработки ДНКазой I можно и опустить, если есть подозрения, что на этой стадии происходят значительные потери материала.

- *¹) Важно не перегрузить градиент (в особенности это касается выделения хлоропластов) во избежание слишком плотного скопления органелл в интерфазе, что может способствовать соосаждению ядерной ДНК. Оптимальное соотношение между числом необходимых пробирок с градиентами и количеством гомогенизируемой ткани составляет примерно 20—30 г свежей ткани на градиент, что определено эмпирически для многих видов растений. Чтобы предотвратить перегрузку градиента хлоропластами, Палмер с сотрудниками [10] предлагает интенсивно смешивать 30%-ую сахарозу верхнего слоя с 52%-ой сахарозой нижнего слоя, при этом интерфаза оказывается диффузной. Можно приготовить градиент и за несколько дней до использования, чтобы между двумя слоями произошла диффузия и был бы достигнут тот же эффект.
- а) Выход и чистота ДНК могут быть улучшены, если перед добавлением детергента в буфер для лизиса обработать органеллы в течение 2 мин при комнатной температуре (либо 15 мин на льду) предварительно прогретой (2 ч при 37 °C) проназой в концентрации 1 мг/мл.
- е) Для более полного лизиса важно, чтобы органеллы перед добавлением раствора детергента были тщательно ресуспендированы. Детергент следует добавлять постепенно.
- ж) Лизаты хлоропластов перед нанесением на градиент CsCl/БЭ часто необходимо освободить от крахмала и остатков клеточных стенок центрифугированием в бакет-роторе при низких скоростях.

4.6. Определение концентрации ДНК в неочищенных препаратах нуклеиновых кислот с помощью дифениламина

4.6.1. Общие положения

Дифениламин [12] можно использовать для цветной реакции с ДНК в неочищенных экстрактах из тканей растений и ее количественного определения посредством спектрофотометрии. Поглощение при 600 нм (OD_{600}) при этой реакции более или менее прямо пропорционально содержанию ДНК в растворе при ее концентрациях от 0 до 100 мкг/мл. В этих пределах строится калибровочная кривая зависимости OD_{600} от концентрации для чистой ДНК. Концентрацию ДНК в пробах, выделенных из растений, затем определяют с помощью этой калибровочной кривой. В связи с тем что концентрация выделенной из растительных тканей ДНК будет различной, целесообразно использовать несколько разведений исходного препарата, чтобы получить значения OD_{600} , попадающие на линейный участок калибровочной кривой.

Специфичность реакции на ДНК подразумевает, что такой способ определения в отличие от измерения оптического поглощения неочищенного экстракта нуклеиновых кислот при 260 нм, легко позволяет отличить РНК и ДНК и гораздо более точен. Таким образом, различие в содержании нуклеиновых кислот, определенное с помощью дифениламина, и измерения OD_{260} позволяют установить содержание примеси РНК в препарате.

4.6.2. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Вытяжной шкаф.
- Термостат на 30 °C, позволяющий инкубировать материал без воздействия света.
- Пластмассовые кюветы (объемом 0,5 мл) с длиной светового пути 1 см (Sarstedt).
- Спектрофотометр, установленный на длину волны 600 нм.
- Стекланный стакан для слива отходов.
- Бумага для графиков.

Растворы

- 3 н. раствор хлорной кислоты: 49,2 мл хлорной кислоты (BDH Analar) доводят до 200 мл дистиллированной водой. Раствор перемешивают и хранят в кислотнице под тягой. Обращаться с ним следует осторожно, поскольку 3 н. хлорная кислота весьма едкая. Раствор стабилен в течение нескольких месяцев при комнатной температуре.
- Раствор дифениламина: готовят 4%-ный раствор дифениламина (BDH Analar) с 0,01% паральдегидом в ледяной уксусной кислоте (BDH Analar) следующим образом.

Примечание: все используемые вещества ядовиты, в особенности дифениламин, и, следовательно, при работе с большими количествами все процедуры следует проводить под тягой. Добавляют 20 мкл паральдегида (BDH Analar) к 198 мл ледяной уксусной кислоты (BDH Analar) в колбе Эрленмейера из пирекса объемом 250 мл.

Осторожно взвешивают 8 г дифениламина (BDH Analar), надев перчатки и респиратор. Добавляют дифениламин к смеси паральдегида с ледяной уксусной кислотой и сразу же прикрывают фольгой, чтобы избежать воздействия света. Перемешивают до полного растворения всего дифениламина. Хранят в кислотнице из пирекса при комнатной температуре в защищенном от света вытяжном шкафу. Если раствор дифениламина начал краснеть, то он не годится для использования. Как правило, при хранении в темноте раствор можно использовать в течение месяца.

- Стерильная дистиллированная вода.
- Стандартные растворы ДНК спермы сельди (Sigma) с концентрацией от 5 до 100 мкг/мл.

4.6.3. Методика

1. Работая под тягой, добавляют реагенты в пробирки Эппендорф, содержащие препараты ДНК из растений или стандартные растворы в следующем порядке:^{а)}
10 мкл раствора ДНК или дистиллированной воды для раствора с нулевой концентрацией
140 мкл дистиллированной воды
150 мкл 3 н. хлорной кислоты
180 мкл раствора дифениламина.
2. Закрывают пробирки, перемешивают растворы, переворачивая пробирки, и инкубируют в темноте 16—20 ч (в течение ночи) при 30 °С. Важно всегда проводить инкубацию в течение одного и того же промежутка времени при одной и той же температуре, иначе каждый раз придется заново строить калибровочную кривую^{б)}.
3. Устанавливают на спектрофотометре длину волны 600 нм и затем выводят показания на нуль с помощью контроля, содержащего дистиллированную воду вместо раствора ДНК. Измеряют OD_{600} для стандартных растворов ДНК и строят калибровочную кривую зависимости OD_{600} от концентрации ДНК.
4. Определяют по калибровочной кривой концентрацию ДНК для каждого образца. Между концентрацией ДНК в диапазоне 5—75 мкг/мл и OD_{600} имеется строгая линейная зависимость^{в)}.
5. Доводят концентрацию выделенной из растений ДНК до 0,25—1,0 мкг/мкл, разводя образцы стерильной дистиллированной водой. Если пробы слишком разбавлены, необходимо сконцентрировать их, осаждая ДНК этанолом и добавляя определенное количество воды.

Примечания

- ^{а)} Реагенты следует добавлять осторожно в указанном порядке при тщательном перемешивании, в противном случае может выпасть осадок. Выпадение осадка в реакционной смеси даже в случае соблюдения всех предосторожностей, может свидетельствовать либо о том, что растворы хлорной кислоты или дифениламина уже старые, либо о том, что хлорная кислота недостаточно чистая. Кроме того, к образованию осадков могут привести использование полистироловых емкостей для хранения растворов дифениламина, перепад температуры, длительная экспозиция на воздухе или избыток полисахаридов в препарате нуклеиновых кислот.
- ^{б)} При одних и тех же температуре инкубации, времени, используя один и тот же спектрофотометр, одну и ту же калибровочную кривую для каждой реакции можно применять с достаточно высокой степенью точности, а не строить каждый раз новый график.
- ^{в)} Если OD_{600} раствора ДНК превышает значение для контрольного раствора ДНК с концентрацией 75 мкг/мл, то точные данные получить невозможно. В таком случае следует разбавить раствор выделенной из растений ДНК и повторить определение.

4.7. Выделение тотальной РНК из растений

4.7.1. Общие положения

Для многих типов клеток методы выделения эукариотической мРНК сходны [2, 14]. Ниже приведены две методики выделения тотальной РНК из растений. В большинстве из них объем буфера для гомогенизации и масса клеточного материала рассчитаны для листьев широколиственных растений, каллусов либо клеток суспензионной культуры. Методика, предусматривающая использование фенола (разд. 4.7.3.1), подходит для выделения РНК из листовых пластинок и культивируемых клеток более чем 20 видов растений. При необходимости можно оптимизировать методики для других типов растительного материала, например листьев злаков, плодов и т. д., чтобы обеспечить эффективную экстракцию РНК и соответствующую обработку экстракта.

Главное внимание при выделении РНК должно быть сосредоточено на подавлении активности рибонуклеаз. При использовании любой из следующих методик во избежание деградации РНК внутри- и внеклеточными ферментами обычно принимают некоторые основные меры предосторожности:

- Стеклянную посуду прогревают в сушильном шкафу (150 °С, 3 ч), автоклавируют либо смачивают 0,5%-ным раствором диэтилпиروкарбоната и высушивают в течение 3 ч при 150 °С. В случае пластмассовой посуды используют лишь такие пробирки, которые можно автоклавировать.
- По возможности все растворы, используемые для выделения РНК, автоклавируют. На рабочем месте следует строго соблюдать чистоту, а чтобы избежать загрязнения рибонуклеазами, присутствующими на коже, исследователь должен надевать одноразовые резиновые перчатки.
- РНК следует хранить в присутствии детергента либо под этанолом при низких температурах (от —20 до —80 °С). По возможности следует использовать вещества высокой степени очистки, например сахарозу, свободную от РНКаз.

4.7.2. Фенольный метод выделения тотальной РНК из растений

4.7.2.1. Обеспечение

Примечание: все растворы для разрушения РНКаз следует обрабатывать, как указано в разд. 4.7.1. Помимо этого стеклянную посуду необходимо силиконировать.

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Большая ступка с пестиком.

- Окись алюминия (Sigma, тип 305).
- Жидкий азот.
- Центрифуга с охлаждением (например, Sorval RC-5B или аналогичная) с угловым ротором 8×50 мл типа Sorvall SS34 (или эквивалентным).
- Полиалломерные центрифужные пробирки с завинчивающимися крышками (например, «Налджин», тип 3119, объем 38 мл).
- Пробирки из корекса объемом 30 мл (силиконированные и стерильные) и резиновые прокладки.
- Конические колбы объемом 250 мл из пирекса.
- Силиконированные пастеровские пипетки.
- Защитные перчатки.
- Одноразовый респиратор.
- Защитная маска либо защитные очки.

Растворы

- Буфер для растирания (6%-ный 4-аминосалицилат; 1%-ный триизопропилнафталинсульфонат (ТНС); 6%-ный фенол; 50 мМ трис-НСl, рН 8,4).

Раствор следует готовить заново непосредственно перед употреблением следующим образом:

Готовят необходимые навески 4-аминосалицилата (Sigma) и ТНС (Kodak).

Раствор фенола: уравнивают фенол (BDH Analag или подвергнутый перегонке), содержащий 0,1% 8-гидроксихинолина, раствором 100 мМ трис-НСl, рН 7,5, и хранят не более 8 нед в темноте при 4 °С.

1 М трис-НСl, рН 8,4.

- Смесь фенол/хлороформ (50,0% фенола, 48,0% хлороформа, 2% изоамилового спирта, 0,1% 8-гидроксихинолина).

Раствор следует готовить заново непосредственно перед употреблением следующим образом:

Смесь фенол/гидроксихинолин готовят так же, как и в случае буфера для растирания (см. выше).

Готовят смесь хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), на нее следует наслоить 100 мМ трис-НСl (рН 7,4) для предотвращения испарения. Раствор можно хранить под тягой в течение нескольких месяцев.

- 4 М ацетат натрия, рН 6,0 (рН доводят ледяной уксусной кислотой, BDH Analag).
- Этанол (абсолютный).
- Стерильная Н₂О. Фильтруют через миллипоровый фильтр и автоклавируют.

4.7.2.2. Методика

Примечание: на всех стадиях, кроме указанных, следует держать экстракты РНК на льду и охлаждать всю посуду.

1. Быстро готовят необходимые навески свежего растительного материала (очищенного от земли, агара или избытка воды) массой 1—5 г и как можно быстрее замораживают после нарезания в жидком азоте. До использования хранят в жидком азоте^{а)}. Для выделения РНК следует по возможности использовать лишь молодую ткань интактных растений либо быстро-растущие культуры клеток.
2. Добавляют 0,5 г окиси алюминия к соответствующему количеству замороженного исходного материала (3 г культуры клеток или 10 г листьев) в предварительно охлажденной ступке и растирают предварительно охлажденным пестиком в мелкий порошок^{б)}.
3. Добавляя по каплям (2 мл/г ткани) буфер для растирания, продолжают измельчение. Время от времени, чтобы ткань не оттаивала, добавляют жидкий азот. Тщательно растирают ткань и переносят ее в замороженном состоянии в колбу объемом 250 мл.
4. Добавляют равный объем смеси фенол/хлороформ и дают смеси оттаять на льду. Надев защитные очки, периодически встряхивают колбу^{в)}, чтобы измельченная в порошок ткань равномерно распределилась по всему объему. Когда гомогенат оттает, переносят его в две полиалломерные пробирки объемом 38 мл и перемешивают, переворачивая их. Разделяют фазы центрифугированием в угловом роторе при 5000 об/мин в течение 10 мин и 4 °С.
5. Стараясь не захватить выпавший в осадок белок интерфазы, переносят силиконированной пастеровской пипеткой водную фазу в новые пробирки и трижды повторяют экстракцию смесью фенол/хлороформ.
6. Переносят аликваты водной фазы объемом 7 мл в четыре пробирки из корекса объемом 30 мл, добавляют 4 М ацетат натрия (рН 6,0) до конечной концентрации 0,2 М и тщательно перемешивают. Добавляют 2,5 объема холодного (—20 °С) этанола, перемешивают, переворачивая пробирки, и собирают общий осадок нуклеиновых кислот центрифугированием (10 000 об/мин, 4 °С, 10 мин). Осадок должен быть белым; если он окрашен, то для удаления примесей следует несколько раз переосадить его спиртом. Осторожно сливают супернатант и тщательно растворяют осадок в минимальном объеме стерильной дистиллированной воды (не более 0,5 мл/г ткани)^{г), д)}.

7. Добавляют 4 М ацетат натрия до конечной концентрации 3,0 М, тщательно перемешивают, помещают на 2—3 ч на лед и центрифугируют при 10 000 об/мин при 4 °С 10 мин, чтобы отделить РНК от ДНК^{е)}. Если осадок не образуется, центрифугируют еще 20 мин. Заново растворяют осадок РНК в минимальном объеме (200—1000 мкл) 0,2 М ацетата натрия и осаждают спиртом (см. стадию 6).

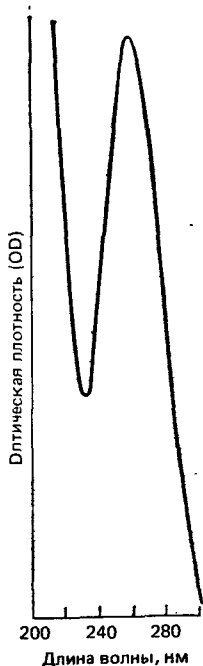


Рис. 4.1. Поглощение в ультрафиолете (200—300 нм) чистого препарата тотальной РНК.

препарат на аликвоты по 0,5 мл в полипропиленовые пробирки с закручивающимися крышками или пробирки Эппендорф.

8. Высушивают в эксикаторе осадок РНК и растворяют его в минимальном объеме (100 мкл) дистиллированной H_2O . Разводят аликвоту тотального препарата РНК и определяют концентрацию РНК на сканирующем спектрофотометре, измеряя OD между 200 и 300 нм ($1,00 OD_{260} = 37$ мкг/мл). По спектру образца можно судить о чистоте препарата. Чистые препараты РНК имеют соотношение $OD_{260} : OD_{280}$ около 2,0 и $OD_{230} : OD_{260}$ менее чем 0,5. Типичная кривая поглощения чистого препарата РНК представлена на рис. 4.1. Необходимо отметить явно выраженный острый пик при 260 нм и отсутствие на кривой «плеч».

9. Разводят раствор РНК водой до концентрации 5 мг/мл и хранят в замороженном состоянии —70 °С или в жидком азоте^{ж)}, если требуется более длительное хранение, разлив препарат

Примечания

- а) Важно не смять материал и не дать ему увянуть, поскольку это влияет на эффективность экстракции и качество препаратов РНК. Повреждение многих типов растительных тканей приводит к быстрому синтезу полифенолов (коричневое окрашивание), которые трудно отделить от нуклеиновых кислот. Образование полифенолов можно свести к минимуму осторожным нарезанием и быстрым замораживанием тканей. Кроме того, необходимо иметь в виду, что в результате поранения очень быстро образуются транскрипты, индуцированные стрессом.

- в) При растирании ткани необходимо соблюдать меры предосторожности. Следует надеть респиратор и защитные очки, чтобы предотвратить вдыхание окиси алюминия и уберечь лицо.
- г) Необходимо встряхивать колбу осторожно, поскольку фенол ядовит, а ТНС — очень едкое вещество. Если даже капля буфера для растирания попадает на кожу, следует промыть поврежденное место смесью этанол/ПЭГ 300 (70 : 30) или глицерином¹.
- д) Очень важно, чтобы осадок полностью растворился, однако часто растворяется не весь материал. Если изначально осадок образует суспензию прозрачных частиц, то весьма вероятно, что он состоит главным образом из РНК. Осадок следует оставить на льду примерно на один час, время от времени перемешивая суспензию РНК силиконизированной пастеровской пипеткой. Если взвешенные частицы непрозрачны, то возможно, что препарат РНК сильно загрязнен полисахаридами. В таком случае следует растворить как можно большую часть осадка, отцентрифугировать нерастворимые примеси при 5000 об/мин в течение 5 мин и отбросить.
- е) Избыток полисахаридов в экстракте не всегда удаляется смесью фенол/хлороформ и может загрязнять препараты РНК на всех стадиях очистки, затрудняя ее растворение и делая невозможными спектрофотометрические измерения. Кроме того, примеси полисахаридов забивают колонки с олиго-(dT)-целлюлозой, а также препятствуют трансляции и синтезу кДНК *in vitro* [13]. Содержание углеводов в растительном материале можно контролировать путем выращивания при низкой интенсивности освещения, либо подбирая такой режим питания растений, который способствует быстрому вегетативному росту, а не запасанию усвоенного углерода. Собирая материал (суспензию клеток, каллус, размножающиеся растения) на стадии быстрого роста, можно свести к минимуму проблемы, возникающие при избытке углеводов.
- В некоторых случаях для полного удаления полисахаридов из экстрактов нуклеиновых кислот используют разнообразные методики. Наиболее распространенные из них основаны на центрифугировании РНК через слой CsCl. Под раствор РНК можно подслоить 1/3 объема 5,7 М CsCl и затем центрифугировать в бакет-роторе в течение 16 ч при 25 000 об/мин и 20 °С. Тяжелая РНК образует рыхлый осадок на дне пробирки, а легкие примеси не проходят через интерфазу.
- ж) ДНК растворима в 3 М ацетате натрия и остается в супернатанте.
- з) Необходимо отметить, что растворы РНК следует замораживать очень быстро, погружая пробирки с открытыми крышками в жидкий азот. Затем в крышках проделывают небольшое отверстие, чтобы при вынимании из жидкого азота предотвратить расширение газа, которое может привести к выбиванию крышек.

4.7.3. Метод выделения тотальной РНК из растений при помощи хлористого лития

4.7.3.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

Те же, что и в разд. 4.7.2.1.

¹ Согласно правилам техники безопасности, растворы, содержащие фенол, ни в коем случае нельзя смывать с кожи спиртом. Для этого следует использовать раствор аммиака или соды (примерно 1 н. или 2%). — *Прим. ред. пер.*

Растворы

Те же, что и в разд. 4.7.2.1 и кроме того:

- 8 М хлористый литий (BDH Analar) (340,2 г/л).
- 70%-ный этанол.

4.7.3.2. Методика

1. Собирают растительную ткань, помещают ее в жидкий азот и либо хранят при -80°C , либо сразу же используют.
2. Растирают ткань пестиком в ступке (пестик и ступка должны быть предварительно охлаждены жидким азотом) с небольшим количеством окиси алюминия под жидким азотом. Смешивают получившийся мелкий порошок с буфером для растирания (используют 2 мл/г ткани) и переносят в стерильную центрифужную пробирку объемом 50 мл (из пирекса или полипропилена). Осторожно покачивают в течение нескольких минут с равным объемом смеси фенол/хлороформ.
3. Центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 мин в роторе Sorval GSA (или аналогичном).
4. Переносят верхнюю водную фазу в чистую пробирку и трижды повторяют экстракцию смесью фенол/хлороформ.
5. Осаждают экстрагированные нуклеиновые кислоты, добавив ацетат натрия до концентрации 0,2 М и 2,5 объема этанола. Оставляют на ночь при -20°C .
6. Центрифугируют в течение 10 мин при 8000 об/мин, промывают осадок, ресуспендируют его в 70%-ном спирте, снова центрифугируют и затем высушивают осадок.
7. Растворяют осадок в минимальном объеме стерильной воды и добавляют половину объема 8,0 М хлористого лития. На 30 мин помещают пробирку на лед, а затем центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин при 4°C . Вся ДНК должна остаться в растворе. Перед тем как растворить РНК в соответствующем количестве стерильной дистиллированной воды, осадок следует дважды промыть 70%-ным этанолом.
8. Отбирают аликвоту препарата РНК и снимают его спектр, чтобы оценить количество и качество РНК. Затем доводят до нужной концентрации и хранят, как на стадиях 8 и 9 разд. 4.7.2.2.

4.8. Выделение poly(A)^+ -мРНК

4.8.1. Общие положения

Эукариотическую информационную РНК (мРНК) можно отделить от других типов РНК в тотальных препаратах путем аффинной хроматографии благодаря наличию полиаденилового

«хвоста» длиной от 20 до 250 н. на 3'-конце молекулы. Обычно используют имеющуюся в продаже *oligo(dT)*-целлюлозу или *poly(U)*-сефарозу. Они состоят из полимеров длиной 10—20 н. (Т либо U), и при высоких концентрациях соли гибридизуются с *poly(A)*⁺-РНК и связывают ее. При этом длина хвоста должна составлять по крайней мере 15—20 н. Рибосомная РНК и тРНК не связываются на колонках с *oligo(dT)*-целлюлозой или *poly(U)*-сефарозой и смываются с них. Связанную мРНК можно затем элюировать буферами с низкой ионной силой. Метод обогащения препарата РНК фракцией *poly(A)*⁺-мРНК приведен ниже.

Хороший способ проверки чистоты препаратов мРНК — это определение эффективности их трансляции *in vitro* в бесклеточной белоксинтезирующей системе [11]. Это особенно важно в случае РНК, подлежащей дальнейшему фракционированию и использованию для синтеза кДНК. Размер РНК можно установить, сравнивая ее с маркерными молекулами при электрофорезе в полиакриламидном геле. Специфические транскрипты в препаратах можно обнаружить с помощью нозерн-блоттинга (приложение 6 [I]).

4.8.2. Обеспечение

Оборудование и расходуемые материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Стерильные силиконированные пастеровские пипетки.
- Зажим и штатив.
- Полипропиленовое волокно (Supa Aquatic Supplies Ltd., синтетическое волокно для фильтрования). Перед работой промывают и автоклавируют.
- Водяная баня на 65 °С.
- Кварцевые микрокуветы (объемом 300 мкл). Хранят в концентрированной HCl. Перед использованием тщательно промывают стерильной дистиллированной водой.
- *Oligo(dT)*-целлюлоза (Sigma).
- Абсолютный спирт.

Растворы

- Буфер для нанесения (20 мМ трис-HCl, pH 7,6; 0,5 М LiCl; 1 мМ ЭДТА; 0,1% ДСН). На 100 мл:

2,0 М трис-HCl, pH 7,6	1,0 мл
LiCl (BDH Analar)	2,12 г
0,5 М ЭДТА	0,2 мл
10%-ный ДСН	1,0 мл

Перед использованием автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

- Буфер для элюции (10 мМ трис-НСl, рН 7,6; 1 мМ ЭДТА; 0,05% ДСН).

На 100 мл:

2,0 М трис-НСl, рН 7,6	0,5 мл
0,5 М ЭДТА	0,2 мл
10%-ный ДСН	0,5 мл.

Автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

- 4 М ацетат натрия, рН 6,0.

4.8.3. Методика

1. Суспендируют необходимое количество *oligo*(dT)-целлюлозы (5—15 мг) в 2 мл стерильного буфера для нанесения в стерильной пробирке из корекса. Дают целлюлозе осесть, сливают супернатант и продолжают суспендировать в стерильном буфере для нанесения до тех пор, пока супернатант не станет абсолютно прозрачным. Переносят взвесь в стерильные силиконированные пастеровские пипетки, предварительно заткнутые стерильным полипропиленовым волокном^{a)}. В описанном ниже примере 5 мг РНК растворяют в 1 мл буфера. Это количество можно нанести на колонку объемом 200—250 мкл, содержащую 5—10 мг *oligo*(dT)-целлюлозы^{b)}. Необходимо убедиться, что в колонке отсутствуют пузырьки воздуха (уплотнять нельзя) и ни в коем случае не следует допускать пересыхания колонки. Промывают 10 мл буфера для нанесения. Скорость выведения должна составлять одну каплю в течение 1—5 с и может регулироваться изменением плотности фильтра либо диаметра колонки (т. е. фильтр может располагаться выше или ниже в месте расширения пастеровской пипетки).
2. Отбирают две аликвоты по 0,5 мл раствора РНК (5 мг) и к каждой добавляют по одному объему двукратного буфера для нанесения. Прогревают (65 °С, 7 мин) и затем помещают на 5—10 мин на лед.
3. Пропускают через колонку последнюю порцию буфера для нанесения и сразу же наносят на колонку препарат РНК в объеме 2 мл. Собирают элюат в ту же пробирку Эппендорф и еще шесть раз повторяют нанесение на колонку.
4. Промывают колонку 10—100 мл^{b)} буфера для нанесения, чтобы смыть тРНК и рРНК.
5. Нагревают буфер для элюции до 45 °С. Промывают колонку последней порцией буфера для нанесения, наносят на колонку пять раз по 200 мкл буфера для элюции. Собирают аликвоты (5×300 мкл^{c)}) выходящей *poly*(A)⁺-мРНК в пробирки Эппендорф.

6. Измеряют при 260 нм концентрацию poly(A)^+ -мРНК ($1,0 \text{ OD}_{260} = 37 \text{ мкг/мл}$).
7. Добавляют 4 М ацетат натрия, рН 6,0, до конечной концентрации 0,2 М, перемешивают и осаждают мРНК 2,5 объемами абсолютного спирта. Препарат хранят под этанолом при -70°C .
8. При необходимости центрифугируют пробирки Эппендорф в мини-центрифуге в течение 5 мин, сливают этанол и высушивают осадок в эксикаторе. Суспендируют poly(A)^+ -мРНК в стерильной дистиллированной воде в концентрации 0,2 мкг/мкл.

Примечания

- a) Данный метод можно использовать для получения как больших, так и незначительных количеств РНК. В приведенной методике колонку делают из стерильной силиконированной пастеровской пипетки, у которой непосредственно перед сужением капилляра расположен фильтр из небольшого кусочка стерильного полипропиленового волокна. С фильтром следует обращаться осторожно и не сжимать его слишком сильно.
- b) Для синтеза кДНК необходимо вновь очистить мРНК и получить poly(A)^{++} -мРНК.
- b) Для анализа препаратов poly(A)^+ -мРНК методом нозерн-блоттинга достаточно промыть колонку 10 мл буфера для нанесения (см. приложение 6[1]). В случае синтеза кДНК это следует делать тщательнее, используя до 100 мл буфера для нанесения.
- c) Этот объем зависит от объема микроюветы, используемой для измерения.

Приложение 4 [1]

Выделение больших количеств тотальной ДНК из клеток растений с помощью СТАВ

1. Смешивают 1 г лиофилизированной растительной ткани с 4 г окиси алюминия (Sigma, тип 305) и растирают в ступке пестиком в очень мелкий порошок. Для разрушения растительной клеточной стенки это, очевидно, самая важная стадия, которая определяет хороший выход ДНК.
2. Переносят порошок в полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 50 мл (например, «Наджин», 3100—0500 или эквивалентную), добавляют 15 мл однократного СТАВ-буфера для экстракции (разд. 4.2.2.1) и осторожно перемешивают одноразовой пластмассовой палочкой (Sarstedt) до гомогенного состояния.
3. Закрывают пробирку и инкубируют в течение 20 мин на водяной бане при 56°C , время от времени осторожно поворачивая пробирку, чтобы экстракт не расслаивался.

4. Охлаждают инкубационную смесь до комнатной температуры. Однако температура не должна опускаться ниже 15°C , иначе СТАВ выпадет в осадок.
5. Добавляют 15 мл смеси хлороформ/октанол (24:1, объем на объем), закрывают пробирку, и, осторожно переворачивая ее, перемешивают содержимое до образования однофазной эмульсии.
6. Осаждают клеточный дебрис и разделяют органическую и водную фазы путем центрифугирования при 8000 g (т. е. при $10\,000$ об/мин в роторе Sorval SS34 объемом 8×50 мл) в течение 10 мин при 20°C .
7. Переносят водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку объемом 50 мл. Стараются не захватывать денатурировавший белок интерфазы.
8. Добавляют 0,1 объема (1,5 мл) 10%-ного СТАВ (разд. 4.2.2.1). Осторожно перемешивают и повторяют экстракцию смесью хлороформ/октанол.
9. Стараясь не захватить дебрис, переносят водную фазу в подходящую стерильную стеклянную центрифужную пробирку (например, пробирку из корекса либо пирекса). Подходят центрифужные пробирки из пирекса для низкоскоростного центрифугирования объемом 16×125 мм (Corning).
10. Добавляют равный объем однократного СТАВ-буфера для осаждения (разд. 4.2.2.1), осторожно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин для формирования осадка. При необходимости образцы можно оставить и на более длительное время.
11. Центрифугируют осадок при 1500 g в течение 10—15 мин при комнатной температуре. Очень важно, чтобы образование осадка происходило не слишком интенсивно, поскольку более плотный осадок труднее растворить. В хороших препаратах осадок должен быть белым, либо слегка окрашенным.
12. Подсушивают осадок, перевернув пробирку в штативе на фильтровальную бумагу. На этой стадии в случае необходимости осадок можно оставить на ночь при 4°C или нанести на градиент CsCl/БЭ в соответствии с методикой, представленной в приложении 4[II].

Приложение 4 [II]

Очистка ДНК из растений в градиентах CsCl/БЭ

Необходимо отметить, что объемы растворов, приведенные в данной методике, можно изменять, если соответственно использовать меньшие количества растворов нуклеиновых кислот, что зависит от объема центрифужной пробирки. Методика

может быть оптимизирована для неочищенных препаратов ДНК, полученных самыми разнообразными способами, а не только с помощью СТАВ. Самое важное — это точно соблюдать плотность CsCl и не перегружать градиент нуклеиновой кислотой.

1. Растворяют осадок, полученный на стадии 12 приложения 4[1], в 2,4 мл 1 М раствора CsCl/БЭ^{а)}, нагревая его до 56 °С на водяной бане. Бромистый этидий позволяет увидеть любой осадок нуклеиновых кислот на стенках центрифужной пробирки. Следует отметить, что, хотя при добавлении 1 М раствора CsCl/БЭ большая часть непрозрачного СТАВ в осадке растворяется быстро, для растворения нуклеиновых кислот требуется более длительное время.
2. Переносят растворившиеся нуклеиновые кислоты в центрифужную пробирку от ротора Beckman VTi 65 либо аналогичную. Добавляют 2,9 мл 7 М раствора CsCl/БЭ^{б)}, закрывают пробирки и перемешивают их содержимое, осторожно переворачивая.
Кроме того, можно довести плотность растворов ДНК в 30 mM трис-HCl, pH 8,0, 10 mM ЭДТА, до 1,55 г/мл, прибавляя CsCl, и затем добавить БЭ (Sigma) до 0,2 мг/мл.
3. Центрифугируют при 58 000 об/мин в течение 4 ч либо при 40 000 об/мин в течение ночи (16 ч) в роторе VTi 65. Если не использовать вертикальный ротор, то может потребоваться более длительное время.
4. Визуализируют ДНК при освещении длинноволновым (320 нм) ультрафиолетом и отбирают зону, проколов пробирку шприцем на 1 мл, снабженном иглой № 19. РНК осаждается на стенку пробирки, и следует соблюдать осторожность, чтобы не захватить ее.
5. Удаляют бромистый этидий пятикратной экстракцией раствора изопропанолом, насыщенным раствором CsCl. Бромистый этидий переходит в органическую фазу, которую можно отбросить.
6. Удаляют CsCl диализом против 2 л дистиллированной воды при 4 °С, меняя воду по крайней мере три раза за 24 ч и постоянно перемешивая ее на магнитной мешалке.
7. Измеряют концентрацию раствора ДНК при 260 нм, используя кварцевые кюветы (1 OD₂₆₀ = 50 мкг/мл). Если препарат загрязнен, можно промерить весь спектр поглощения ДНК в интервале от 200 до 300 нм. Чистый препарат даст острый пик поглощения при 260 нм, а соотношение OD₂₆₀ : OD₂₈₀ составит около 1,8.
8. Добавляют 0,1 объема 3 М ацетата натрия и осаждают ДНК двумя объемами холодного этанола при —20 °С в течение ночи, либо 30 мин при —70 °С.

9. Осаждают выпавшую ДНК центрифугированием в течение 3 мин в мини-центрифуге либо в течение 15 мин при 8000 об/мин в центрифуге Sorval или аналогичной в силиконовой пробирке из корекса. Высушивают осадок под вакуумом и заново растворяют его в стерильной дистиллированной воде, доводя до требуемой концентрации ДНК. Препарат ДНК, хранящийся при -20°C , остается интактным в течение ряда лет. ДНК можно хранить и в виде промытого спиртового осадка под 80%-ным спиртом.

Примечания

- а) 1 М раствор CsCl/БЭ содержит 1 М CsCl в 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл БЭ (Sigma).
- б) 7 М раствор CsCl/БЭ содержит 7 М CsCl, 0,1% саркозила, 0,2 мг/мл БЭ.

Литература

1. *Boulnois G.* (1987) Principles of Gene Cloning and Analysis: A Laboratory Guide. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
2. *Brawerman G.* (1974) The isolation of messenger RNA from mammalian cells. *Methods in Enzymol.* **30**, 605—12.
3. *Covey S. N., Hull R.* (1981) Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of transcripts, properties and location of the gene encoding the virus inclusion body. *Virology* **111**, 463—74.
4. *Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B.* (1985) Maize DNA miniprep. In: *Molecular Biology of Plants: A Laboratory Course Manual*, pp. 36—37. Eds. Malmberg R., Messing J., Sussex I. Cold Spring Harbor Press, New York.
5. *Hanson M. R., Boeshore M. L., McClean P. E., O'Connell M. A., Nivison H. T.* (1986) The isolation of mitochondria and mitochondrial DNA. *Methods in Enzymol.* **118**, 437—53.
6. *Lichtenstein C. P., Draper J.* (1985) Genetic Engineering of plants. In: *DNA Cloning*, Vol. II, pp. 67—119. Ed. Glover D. M. IRL Press, Oxford.
7. *Luthe D., Quatrano R.* (1980) Transcription in isolated wheat nuclei. II: Characterisation of RNA synthesised *in vitro*. *Plant Physiol.* **65**, 309—13.
8. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., eds* (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
9. *Murray M. G., Thompson W. F.* (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**, 4321—5.
10. *Palmer J. D.* (1986) Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Methods in Enzymol.* **118**, 167—86.
11. *Pelham H. R. B., Jackson R. J.* (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247—56.
12. *Richards G. M.* (1974) Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal. Biochem.* **57**, 369—76.
13. *Takahashi H., Nitta T.* (1986) Altered fractionation profiles of higher plant poly(A)-containing RNA by selective formation of a complex with a hydrophobic impurity. *Plant Science* **43**, 63—7.
14. *Taylor J. M.* (1979) The isolation of eukaryotic messenger RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 681—717.
15. *Walling L., Drews G. N., Goldberg R. B.* (1986) Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean protein mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2123—7.
16. *Watson J. C., Thompson W. F.* (1986) Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. *Methods in Enzymol.* **118**, 57—75.

Анализ ДНК путем рестрикции и гибридизации по Саузерну

Р. Скотт

5.1. Введение

Гибридизацию по Саузерну [7] используют для выявления и изучения организации последовательностей ДНК после их разделения с помощью гель-электрофореза. Процедура гибридизации подразделяется на два этапа. Первый этап — перенос разделенных фрагментов ДНК на нитроцеллюлозную мембрану, осуществляемый под действием капиллярных сил (в последнее время применяется электроперенос) таким образом, чтобы относительное положение каждой молекулы ДНК осталось неизменным. Второй этап — гибридизация связанной ДНК с пробами, меченными изотопами (комплементарной ДНК), для выявления определенных последовательностей ДНК. Анализ ДНК по Саузерну включает в себя апуринизацию, денатурацию и нейтрализацию ДНК внутри геля с последующим переносом и связыванием нуклеиновой кислоты с мембраной. Далее мембрану инкубируют с одноцепочечной пробой, меченной радиоактивным изотопом, а после отмывания — выявляют гибридизовавшиеся гомологичные фрагменты ДНК путем автордиографии с использованием рентгеновской пленки.

В данную главу включено подробное описание обработки ДНК рестриктазами, электрофореза в агарозном геле, а также переноса и гибридизации по Саузерну. Этот подход составляет основу многих методик, описанных в гл. 1, 3, 4 и 6.

Основная задача данной главы — дать общее представление о рестрикционной обработке различных препаратов ДНК. Подробные указания по обработке «мини-препаратов» ДНК *E. coli*, тотальной ДНК агробактерий и ДНК растений приведены в соответствующих разделах гл. 1 и 4. Указания по нанесению рестрицированных образцов ДНК и детали, связанные с приготовлением индивидуальных проб для гибридизации по Саузерну, широко освещены в других разделах (гл. 1 и 4). Способ заливки агарозных гелей, блоттинг-гибридизация по Саузерну и мечение ДНК с помощью олигонуклеотидной затравки, приведенные в данном разделе, универсальны для всех описанных в других разделах экспериментов и могут применяться без изменений.

5.2. Обработка ДНК ферментами рестрикции

5.2.1. Общие положения

Рестриктазы, впервые открытые благодаря их действию на чужеродную ДНК, попавшую в бактериальную клетку, представляют собой основной рабочий инструмент молекулярного биолога. К настоящему времени охарактеризованы многочисленные ферменты рестрикции, но наибольшее внимание уделяется ферментам типа II, поскольку именно они узнают определенные последовательности нуклеотидов внутри или около сайта их действия и разрезают обе нити двухцепочечной молекулы ДНК определенным образом. Обычно за единицу (ед.) активности рестриктазы принимают активность, при которой 1 мкг ДНК фага λ разрезается за 1 ч при 37°C (либо при иной температуре) в оптимальных условиях. На активность фермента может влиять ряд факторов: температура, ионный состав буфера, метод выделения ДНК и соответственно степень ее загрязнения, а также уровень и специфичность метилирования ДНК. В связи с тем что имеющиеся в продаже препараты рестриктаз высокоочищены, при увеличении длительности инкубации и использовании большего количества фермента либо и того и другого вместе многие проблемы, связанные с количеством препарата ДНК вполне можно игнорировать.

При обычной обработке ДНК рестриктазами удобно проводить реакцию в небольшом объеме, например в 20—40 мкл, когда раствор ДНК, десятикратный буфер и фермент доводят до нужного объема стерильной дистиллированной H_2O .

Хотя для каждого фермента оптимальный состав буфера свой, чаще всего используют три типа буфера^{а)}:

десятикратный с высокой ионной силой:	100 мМ трис, pH 7,5 100 мМ $MgCl_2$ 1000 мМ NaCl
десятикратный со средней ионной силой:	100 мМ трис, pH 7,5 100 мМ $MgCl_2$ 10 мМ ДТТ 500 мМ NaCl
десятикратный с низкой ионной силой:	100 мМ трис, pH 7,5 100 мМ $MgCl_2$ 10 мМ ДТТ.

Если необходимо провести обработку одного препарата ДНК несколькими рестриктазами, то конечные концентрации компонентов буфера каждый раз доводят до нужных значений^{б)}.

- 4) Удаляют органическую (верхнюю) фазу и осаждают нуклеиновую кислоту, добавив 2,5 объема холодного (-20°C) этанола. Перемешивают и затем инкубируют в смеси сухой лед/этанол в течение 15 мин.
- 5) Собирают осевшую ДНК центрифугированием при 12 000 об/мин в мини-центрифуге в течение 10 мин. Промывают осадок 70%-ным спиртом.
- 6) Осторожно сливают супернатант и высушивают под вакуумом осадок, который иногда не виден.
- 7) Ресуспенсируют осадок в стерильной дистиллированной H_2O и отбирают аликвоту для обработки вторым ферментом.
- в) Количество обрабатываемой ДНК в большой степени зависит от ее источника [например, очищенный препарат плазмидной ДНК или мини-препарат (разд. 1.8), тотальная ДНК агробактерий (разд. 1.11) либо геномная ДНК растений (разд. 6.2.3)], от числа ожидаемых сайтов рестрикции и размера дорожки в агарозном геле, в котором проводят фракционирование.
- г) Буфер для хранения рестриктаз часто содержит 50%-ный глицерин, а поскольку концентрации глицерина выше 5% влияют на активность большинства ферментов, объем вносимого фермента не должен превышать 10% объема реакционной смеси.
- а) Время инкубации можно варьировать как для удобства, так и в зависимости от концентрации ДНК, наличия примесей в препарате или низких концентраций рестриктаз.
- е) После добавления буфера для нанесения на гель препараты должны быть сразу же нанесены на агарозный гель для анализа либо, если объем велик, ДНК можно сконцентрировать осаждением спиртом (см. выше стадии 4—7 или примечание б).

5.3. Фракционирование ДНК методом электрофореза в агарозном геле

5.3.1. Общие положения

Фракционирование нуклеиновых кислот путем электрофореза в агарозе — это наиболее удобный метод анализа как ДНК, так и РНК. В данной главе изложен метод электрофоретического разделения ДНК, предварительно обработанной рестриктазами. Метод основан на том, что скорость миграции линейных молекул ДНК в электрическом поле пропорциональна их длине. Таким образом, можно довольно легко разделить фрагменты ДНК разной длины, а также определить размер, сравнивая скорость их миграции в геле с маркерными ДНК известного размера. Полосы ДНК видны при освещении ультрафиолетом после окрашивания геля флуоресцирующим интеркалирующим красителем бромистым этидием в низкой концентрации. Такой метод окрашивания обладает большой чувствительностью и позволяет обнаруживать зоны, содержащие всего 2 нг ДНК.

Скорость миграции ДНК в агарозном геле определяется в основном размером молекулы ДНК, ее конформацией и концентрацией агарозы. Линейные двухцепочечные молекулы ДНК

мигрируют в агарозе со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их мол. массы [3]. Таким образом, для калибровки необходимо построить линейный график, нанося на оси координат пройденный путь в зависимости от $\lg$ мол. массы соответствующего маркера. Концентрация агарозы значительно влияет на скорость миграции молекул ДНК в геле. Молекулы ДНК одного размера мигрируют с разными скоростями в тех гелях, которые имеют различные концентрации агарозы. Таким образом, для достижения желаемого разделения фрагментов ДНК необходимо тщательно подобрать концентрацию агарозы. Это обстоятельство может оказаться и преимуществом, поскольку, варьируя концентрацию агарозы, можно разделять фрагменты ДНК в широких пределах мол. массы. Например, большие фрагменты ДНК (5—60 т. п. н.) можно разделять в гелях с низкой концентрацией (0,3%), а небольшие фрагменты (0,1—3,0 т. п. н.) — в гелях с высокой (2%) концентрацией агарозы. Чаще всего используют гели с концентрацией агарозы 0,8%, в которых достигается успешное разделение фрагментов от 0,5 до 10 т. п. н. Кольцевые формы ДНК, например плазмиды, ведут себя в геле не так, как линейные фрагменты: замкнутая кольцевая (I), открытая кольцевая (II) и линейная (III) формы одной и той же плазмидной ДНК мигрируют в агарозном геле с разной скоростью.

5.3.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1[I]).
- Высококачественная агароза с высокой температурой плавления (например, Miles Scientific, HGT)^{a)}.
- Столик для заливки геля с уровнем.
- Комплект для горизонтального электрофореза (например, LKB, Biograd, BRL).
- Клейкая лента (например, «Скотч»).
- Источник питания для электрофореза (например, источник постоянного тока LKB 2197, 2500 В, 250 мА, 100 Вт).
- Пленка «Поляроид» тип 57.
- Камера «Поляроид», снабженная красно-оранжевым фильтром (Wratten 23A).
- Транслюминатор (хемископ) (например, УФ Products Ltd.), снабженный защитным щитом из оргстекла (толщиной по крайней мере 5 мм) или стекла; красно-оранжевый фильтр может быть составной частью щита.

Растворы

- Десятикратный буфер для электрофореза, содержащий трис-ацетат и ЭДТА (ТАЭ-буфер)⁶⁾ (400,0 мМ трис-ацетат, рН 8,0; 10,0 мМ ЭДТА).

На 1 литр:

Трис-ОН 48,4 г
0,5 М ЭДТА 20,0 мл.

Доводят рН до 8,0 ледяной уксусной кислотой (примерно 11,4 мл/л). Для получения однократного буфера используют дистиллированную H_2O . Хранят при комнатной температуре.

- Однократный ТАЭ-буфер + 5,0 мкг/мл бромистого этидия (ТАЭ/БЭ-буфер).

На 10 литров:

Десятикратный ТАЭ-буфер 1,0 л
Дистиллированная H_2O 9,0 л
5 мкг/мл бромистого этидия 10,0 мл

- Буфер для нанесения на гель (50%-ный глицерин; 250 мМ ЭДТА, рН 8,0; 0,01%-ный бромфеноловый синий). На 100 мл:

Глицерин 50,0 мл
1,0 М ЭДТА, рН 8,0 25,0 мл
Бромфеноловый синий 10,0 мг.

Доводят до 100 мл дистиллированной H_2O . Хранят при комнатной температуре.

- Смесь радиоактивно меченной (приложение 5 [II]) и немеченной маркерной ДНК фага λ , обработанной *HindIII* (1 мг/мл)^{в)}.

5.3.3. Методика

В связи с тем, что температура, по крайней мере в интервале от 4 до 30 °С, слабо влияет на свойства ДНК при электрофорезе, всю процедуру обычно проводят при комнатной температуре. Однако гели с низкой концентрацией агарозы (менее 0,5%) довольно хрупкие, и с ними можно работать при 4 °С.

1. Добавляют агарозу к однократному ТАЭ/БЭ-буферу^{г)} в количестве, необходимом для получения требуемой концентрации и толщины геля 0,5—0,7 см. Полностью растворяют агарозу при кипячении^{д)}.

Например, для того, чтобы залить 0,8%-ный гель размером 13×11×0,7 см следует растворить 0,8 г агарозы в 100 мл однократного ТАЭ/БЭ-буфера.

2. Готовят чистую форму для геля из оргстекла или обычного стекла, заклеив края липкой лентой. На расстоянии 2 —

- 3 см от одного конца помещают гребенку, убедившись, что зубья не касаются дна формы^{е)}, и осторожно наливают в нее охлажденную^{ж)} расплавленную агарозу. Следует избегать образования пузырьков, особенно вокруг гребенки.
3. Дают агарозе застыть в течение 30—40 мин при комнатной температуре. При застывании агароза немного мутнеет.
 4. Осторожно^{е)} вынимают гребенку и помещают гель в прибор для электрофореза. В приборе должно содержаться такое количество однократного ТАЭ/БЭ-буфера, чтобы гель был покрыт им на 1—2 мм^{з)}. Подсоединяют^{и)} прибор к выключенному источнику питания.
 5. Рассчитывают количество наносимого образца^{к), л)}. Доводят образец до 20—40 мкл дистиллированной H₂O, добавив 3 мкл буфера для нанесения и тщательно перемешивают.
 6. Наносят маркерную ДНК фага λ ^{в)} на самую крайнюю дорожку, а затем наносят образцы ДНК, обработанные рестриктазами.
 7. Электрофорез проводят при 25—100 В, пока бромфеноловый синий не будет находиться в 2—3 см от края геля (3—10 В/ч/см). Электрофорез может длиться 2—2,5 ч или в течение ночи в зависимости от хода эксперимента.
 8. Качество электрофореза проверяют с помощью хемискапа^{м)}, а затем гель фотографируют^{н)} камерой «Поляроид», снабженной красно-оранжевым фильтром¹. На рис. 5.1 показаны полностью рестрицированные и разделенные путем электрофореза образцы ДНК из разных источников. Полосы калибровочных фрагментов ДНК (ДНК фага λ , рестрицированная *Hind*III) должны быть четкими и хорошо разделившимися (дорожка 1), чтобы при необходимости можно было бы построить калибровочную кривую. Если полосы разделяются плохо, разрешение можно повысить либо увеличив время, либо подобрав соответствующую концентрацию агарозы^{г), о)}. Препараты плазмидной ДНК, обработанной рестриктазой (дорожка 2), должны достаточно хорошо разделиться, чтобы дальнейшую работу, например приготовление проб (разд. 5.6) либо выделение определенных фрагментов (разд. 1.5), можно было бы проводить без затруднений и иметь незагрязненные препараты. При электрофорезе рестрицированной тотальной ДНК агробактерий обычно видно множество полос различной интенсивности (дорожка 3), тогда как при рестрикции геномной ДНК растительного или животного происхождения (дорожка 4)

¹ У нас в стране гель обычно фотографируют на пленку «Микрат-300» с оранжевым светофильтром ОС-12. — *Прим. ред. пер.*

наблюдается более или менее равномерное распределение ДНК по всей дорожке.

Примечания

- ^{*)} Известны различные типы агарозы. Главные критерии при выборе типа агарозы — это цель эксперимента (картирование или очистка фрагментов ДНК), чистота, твердость и другие подобные свойства, а также прозрачность и тугоплавкость (см. также примечание б к разд. 5.4.3).

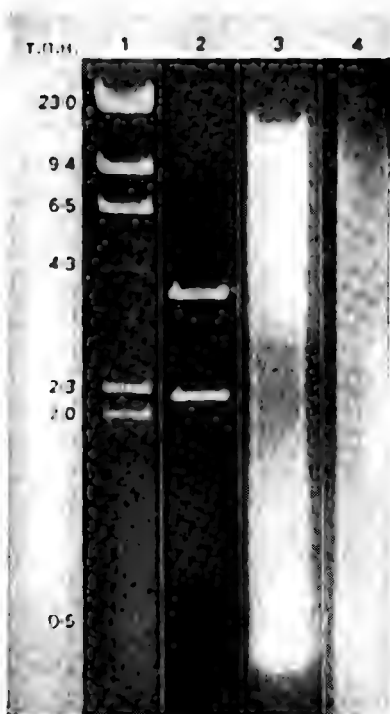


Рис. 5.1. Рестрицированная ДНК из различных источников после электрофореза в агарозном геле и окрашивания бромистым этидием. Дорожка 1 — калибровочные фрагменты ДНК бактериофага λ , обработанной *Hind*III. 2 — при обработке рестриктазой ДНК плазмиды образуются хорошо различимые фрагменты. 3 — тотальная ДНК агробактерий, обработанная рестриктазой. 4 — тотальная ДНК растения, обработанная рестриктазой.

- ^{*)} Как ТАЭ, так и ТВЭ (ТВЭ = 89 мМ трис-ОН; 89 мМ борная кислота, 25 мМ ЭДТА, pH 8,3) широко используются для электрофореза и хранятся при комнатной температуре в виде десятикратных растворов. Однако при длительном хранении ТВЭ образует растворимый в щелочи осадок. Оба буфера можно использовать многократно.

Таблица 5.1. Размер фрагментов ДНК фага λ , образующихся при обработке *EcoRI* и/или *HindIII*

$\lambda \times \text{HindIII}$ (п. н.)	$\lambda \times \text{HindIII} + \text{EcoRI}$ (п. н.)
23 130	21 226
9416	5148
6557	4973
4361	4277
2322	3530
2027	2027
564	1904
125	1584
	1330
	983
	831
	564
	125

- в) Обычно в качестве маркера используют ДНК фага λ , обработанную *HindIII* или *HindIII* и *EcoRI*. Размеры образующихся (п.н.) при этом фрагментов ДНК приведены в табл. 5.1.
Ряд фирм поставляют маркеры, уже готовые к употреблению. Например, Boehringer Mannheim: ДНК фага λ , обработанная *HindIII*, кат. № 236250; ДНК фага λ , обработанная *EcoRI* и *HindIII*, кат. № 528552. Для блоттинг-гибридизации по Саузерну часть препарата фрагментов ДНК фага λ может быть помечена концевой меткой (приложение 5 [II]), и, таким образом, положение маркеров может быть выявлено при радиоавтографии.
- г) В табл. 5.2 указаны концентрации агарозы, подходящие для эффективно-го разделения линейных молекул ДНК разного размера.
- д) Агарозу удобнее всего растворять, доводя до кипения в микроволновой печи при периодическом помешивании. **Внимание:** во время нагревания необходимо убедиться, что крышка флакона закрыта неплотно. Кроме того, агарозу можно растворять, осторожно нагревая ее на водяной бане над газовой горелкой, постоянно перемешивая во избежание подгорания либо нагревая паром, при этом следует следить, чтобы сконденсировавшийся пар не попал в сосуд. Иногда необходимо дважды доводить агарозу до кипения, встряхивая ее, чтобы убедиться, что произошло полное растворение.
- е) Зубья гребенки не должны доходить до дна на 0,5—1,0 мм, чтобы дно лунок было закрыто агарозой. Необходимо и очень осторожно вынимать гребенку, чтобы не повредить лунки. Из поврежденных лунок или лунок с дырявым дном образец вытекает.
- ж) Во избежание повреждения формы для геля, изготовленной из оргстекла, перед заливкой агарозы следует охладить примерно до 50 °С.
- з) Сопротивление геля и буфера примерно одинаково, и, следовательно, ток в основном проходит через гель.
- и) ДНК мигрирует от минуса к плюсу или «от большего к меньшему» — это очень удобно для проверки полярности и связано с тем, что на отрицательном электроде образуется гораздо больше пузырьков, чем на положительном.
- к) Если продукты расщепления чистой плазмидной ДНК рестриктазами требуется выявить с помощью окрашивания бромистым этидием, то следует

Таблица 5.2. Оптимальная концентрация агарозы для разделения фрагментов ДНК различного размера

Концентрация агарозы (%)	Пределы разделения (т. п. н.)
0,3	5—60
0,6	1—20
0,7	0,8—10
0,8	0,5—10
0,9	0,5—7
1,2	0,4—6
1,5	0,2—4
2,0	0,1—3

нанести около 0,1 мкг ДНК в расчете на каждую предполагаемую зону. Если фрагменты необходимо проанализировать методом блоттинг-гибридизации по Саузерну, то не следует наносить более 1—10 нг ДНК на одну полосу, чтобы избежать получения «выжженных» автографов, где могут оказаться неразличимыми важные детали. Поведение тотальной ДНК агробактерий менее предсказуемо, однако в большинстве случаев для блоттинг-гибридизации по Саузерну достаточно нанести количество ДНК, соответствующее 10^6 — 10^7 геномам (10—100 нг). Максимальное количество ДНК, которое можно нанести в одну лунку, не перегружая ее¹, составляет около 10 мкг. Для организмов с большими геномами, как у растений, это ограничение означает, что в каждой зоне содержится относительно мало ДНК, следовательно, при блоттинг-гибридизации по Саузерну потребуется максимальная эффективность. И в этом случае следует наносить количество ДНК, соответствующее 10^6 — 10^7 геномам, что для большинства высших растений составляет 5—10 мкг ДНК (разд. 6.2.3, примечание а).

- *) Минимальное количество ДНК, которое может быть выявлено окрашиванием БЭ в полосе геля шириной 0,5 см, составляет приблизительно 2 нг. Проявления перегрузки (размывание полосы по дорожке) возникают при нанесении более 200 нг ДНК на зону шириной 0,5 см. Аналогичный эффект может проявиться, если перед нанесением на гель ДНК не полностью растворилась.
- *) Если нуклеиновую кислоту фракционируют в отсутствие БЭ, окрашивание можно провести после электрофореза, поместив гель на 30 мин в раствор, содержащий 5 мкг/мл БЭ. Для снижения фонового свечения, вызванного присутствием несвязавшегося БЭ, следует промыть гель в течение 30 мин в буфере для электрофореза или в дистиллированной воде. *Примечание: длительная промывка может привести к исчезновению слабых зон.*
- *) Во избежание повреждения ДНК, вызываемого «фотосшивками», следует сфотографировать гель и далее производить вычисления и расчеты, основываясь на снимках, а не рассматривать гель, лежащий на включенном гемископе.
- *) Гель может быть вновь помещен в аппарат для дальнейшего электрофореза¹.

¹ Для этого гель следует окрашивать в растворе БЭ в однократном буфере для электрофореза, а не в воде. — *Прим. ред. пер.*

5.4. Блоттинг по Саузерну обработанных рестриктазами и разделенных фрагментов ДНК

5.4.1. Общие положения

После того как обработанная рестриктазами ДНК разделена путем электрофореза в агарозном геле, следующий этап заключается в переносе (блоттинге) разделенных фрагментов ДНК на соответствующий фильтр. Впервые метод блоттинга описан Саузерном [7]. Незначительно видоизменив сам метод, во многих лабораториях заменили нитроцеллюлозный фильтр, используемый в оригинальной методике, на более прочные нейлоновые фильтры. Кроме того, что они более прочные, эти фильтры повышают чувствительность гибридизации и их можно использовать многократно, причем чувствительность при этом не снижается (см. примечание ж в разд. 5.5.3). В любом случае ДНК необходимо вначале перенести с геля на подложку. Фрагменты ДНК большего размера обычно переносятся не очень эффективно, и в связи с этим ДНК частично апуринизуют, обрабатывая кислотой, чтобы раздробить молекулы ДНК на фрагменты меньших размеров [9]. Затем ДНК в геле денатурируют *in situ*, обрабатывая концентрированной щелочью, и перед переносом нейтрализуют, чтобы не повредить фильтр. В результате этого процесса ДНК становится одноцепочечной. При использовании нитроцеллюлозных, но не нейлоновых фильтров это абсолютно необходимо для закрепления ДНК и вне зависимости от типа подложки обеспечивает эффективность гибридизации. С появлением нейлоновых подложек изменился и «традиционный» метод капиллярного переноса, разработанный Саузерном. Данный метод в настоящее время можно заменить электропереносом, который гораздо быстрее капиллярного (1—2 ч по сравнению с 12—16 ч), но приводит к некоторому снижению чувствительности [4]. После переноса ДНК должна быть «зафиксирована» на фильтре. В оригинальном методе Саузерна это осуществляется путем прогревания нитроцеллюлозного фильтра в течение нескольких часов при 80 °С. Для нейлоновых мембран данная процедура заменена ультрафиолетовой сшивкой, что занимает несколько минут. Сшивка ультрафиолетом главным образом приводит к повышению чувствительности нейлоновых фильтров, а также повышает и чувствительность гибридизации на обычной нитроцеллюлозе [4]. К сожалению, на практике эта стадия вызывает некоторые затруднения, поскольку неизвестно, какая доза ультрафиолетового облучения требуется для каждого из известных в настоящее время типов нейлоновых фильтров. В связи с этим в:

методику включена стадия эмпирической калибровки имеющегося в наличии источника ультрафиолета для каждого вида фильтра.

5.4.2. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Пластмассовая коробка (Steward Plastics). Гель должен помещаться в эту коробку и иметь возможность незначительно перемещаться в ней.
- Покачиваемая платформа или качалка с круговым вращением.
- Плоская губка из целлюлозы (например, губка для пола Addis размером $21 \times 14 \times 3,5$ см).
- Пластмассовая кювета ($33 \times 23 \times 5$ см).
- Бумажные полотенца (пачка толщиной 5—10 см).
- Груз (наполненный водой медицинский матрас объемом 500 мл).
- Маленькая жесткая пластмассовая крышка от коробки (Steward Plastics).
- Бумага Whatman 3 MM.
- Нейлоновый фильтр для гибридизации типа Hybond (Amersham).
- Тонкая полимерная пленка типа Saran Wrap (Dow Chemical Company).

Растворы

- 5 М NaCl. Растворяют 292,2 г в 750 мл дистиллированной H_2O и доводят до 1 л.
- 2 М трис-HCl, pH 7,6. *На 1 литр:* растворяют 242,0 г в 800 мл дистиллированной H_2O и доводят до требуемого pH концентрированной HCl с помощью электрода для трис-буферов (Sigma).
Доливают до 1 л дистиллированной H_2O .
- $20 \times SSC$ (3,0 М NaCl; 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0).
На 10 литров:
NaCl 1753,0 г
Цитрат натрия 882,0 г
Растворяют в 8 л дистиллированной H_2O и доводят до необходимого объема. pH раствора обычно не требует доводки.
- Раствор для апуринизации (0,25 М HCl). *На 1 литр:*
HCl (плотность 1,16; 10,15 М) 25,0 мл

- Дистиллированная H_2O 975,0 мл.
- Денатурирующий раствор (0,5 М NaOH, 1,5 М NaCl). На 1 литр:
- | | |
|----------|----------|
| NaOH | 20,0 г |
| 5 М NaCl | 300,0 мл |
- Дистиллированная H_2O до 1 л.
- Раствор для нейтрализации (3,0 М NaCl; 0,5 М трис-HCl, pH 7,4).
- На 1 литр:
- | | |
|----------------------|------------------------------|
| 5 М NaCl | 600,0 мл (либо 175,3 г соли) |
| 2 М трис-HCl, pH 7,4 | 250,0 мл |
- Дистиллированная H_2O до 1 л.
- $3\times SSC$. На 1 литр:
- | | |
|-------------------------|-----------|
| $20\times SSC$ | 150,0 мл |
| Дистиллированная H_2O | 850,0 мл. |

5.4.3. Методика

1. Фотографируют гель в УФ-свете и отмечают положение маркеров, а также общий вид разделенной ДНК (см. стадию 8 в разд. 5.3.3). Для облегчения последующих действий иногда удобно поместить гель на кусок полимерной пленки (Saran Wrap).
2. Переносят гель в пластмассовую коробку и заливают его двумя-тремя объемами (по отношению к объему геля) раствора для апуринизации^{а)}. Помещают на 7 мин на качалку, установленную на небольшую скорость.
3. Сливают раствор, промывают гель дистиллированной водой и заливают его двумя-тремя объемами (по отношению к объему геля) раствора для денатурации. Помещают на период от 30 мин до 2 ч^{б)} на качалку, как описано на стадии 2.
4. Сливают раствор, промывают гель дистиллированной водой и заливают его двумя-тремя объемами (по отношению к объему геля) раствора для нейтрализации на период от 30 мин до 2 ч^{б)}. Помещают коробку с гелем на качалку.
5. Промывают гель дистиллированной водой и собирают прибор для блоттинг-гибридизации, как указано на рис. 5.2.
6. Заполняют поднос прибора для блоттинг-гибридизации раствором $20\times SSC$ ^{в)} таким образом, чтобы он на 0,5 см не доходил до поверхности губки. Накрывают губку двумя листами Whatman 3 MM, вырезанными по размеру губки, и дают им пропитаться раствором $20\times SSC$.
7. Отрезают кусок полимерной пленки (Saran Wrap) по размеру губки. Используя форму для заливки геля в качестве

шаблона, вырезают в пленке отверстие по размеру геля и помещают пленку на губку, покрытую бумагой.

8. Сперва необходимо убедиться, что фильтровальная бумага пропиталась $20 \times \text{SSC}$, а затем помещают гель на отверстие, прорезанное в пленке, избегая попадания пузырьков воздуха между гелем и бумагой.
9. Нейлоновые фильтры Nubond проложены двумя предохраняющими их листами. Ни в коем случае нельзя прикасаться к фильтру руками. Следует надеть новые одноразовые рези-

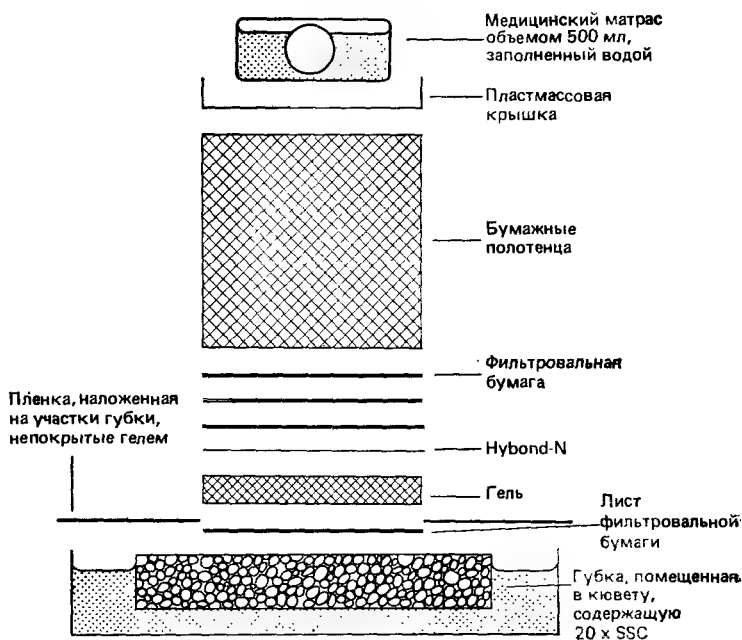


Рис. 5.2. Схема блоттинга по Саузерну.

новые перчатки. В противном случае любое загрязнение может привести к неспецифическому связыванию ДНК-пробы. Держа фильтр между предохраняющими его листами, вырезают кусок по размеру геля, опять используя в качестве шаблона форму для геля. Примечание: необходимо надписать фильтр и отметить его ориентацию.

10. Помещают сухой¹⁾ фильтр Hybond на гель, избегая попадания пузырьков воздуха между ними.

11. Помещают на фильтр два слоя бумаги Whatman 3 MM, вырезанной по размеру геля и смоченной 20×SSC (следите, чтобы не попадали пузырьки воздуха). Закрывают сверху минимум четырьмя листами Whatman 3 MM, вырезанными по размеру геля.
12. Помещают поверх бумаги Whatman 3 MM слой бумажных полотенец толщиной 10 см, а на них — кверху дном твердую пластмассовую крышку. Равномерное давление может обеспечить лежащий на боку медицинский матрас, заполненный водой из крана. Оставляют на ночь.
13. Осторожно удаляют крышку с грузом и бумагу. Снимают фильтр Hybond, быстро споласкивают его 3×SSC и высушивают между листами бумаги Whatman 3 MM при 65 °C в течение 20 мин^{а)}.
14. Помещают Hybond той стороной, которой он соприкасался с гелем, на тонкую прозрачную хлорвиниловую пленку типа Saran, прикрывающую фильтр хемискапа, и освещают в течение 4 с. Либо помещают фильтр Hybond на кусок бумаги Whatman 3 MM^{б)} и освещают ДНК сбоку УФ-светом (например, лампой Phillips TUV, 15 Вт на расстоянии 12 см в течение 2 мин).
См. примечание ж) и далее о калибровке различных источников УФ-света.
15. Теперь фильтр можно хранить внутри сложенного листа фильтровальной бумаги в сухом месте либо сразу же использовать для гибридизации ДНК.

Примечания

- а) Апуринизация приводит к фрагментации больших молекул ДНК, что повышает эффективность их переноса.
- б) 30 мин — это минимальное время инкубации. Если используют высококачественную агарозу (например, Miles Scientific; SeaPlaque), то время инкубации можно увеличить до 2—3 ч. В случае неполной нейтрализации геля нитроцеллюлоза становится весьма ломкой, а в некоторых случаях разрушается полностью. Таким образом, если возможно, лучше нейтрализовать дольше чем 30 мин.
- в) Найлоновые фильтры в отличие от нитроцеллюлозных связывают нуклеиновые кислоты в буферах с низкой ионной силой, что позволяет осуществлять электроперенос при низких концентрациях солей [1, 4, 8].
 - 1) Нейтрализуют гель 1 М фосфатом натрия (рН 6,5) в течение 30 мин.
 - 2) Электрофоретически переиосят ДНК в полусухом приборе для блоттинг-гибридизации в 25 мМ фосфате натрия (рН 6,5) при 4 °C в течение 2 ч (27 В, 0,9 А).
 - 3) Фиксируют ДНК на подложке, как на стадии 14 разд. 5.4.3. В связи с тем, что прогревание резко снижает эффективность гибридизации на многих найлоновых фильтрах [4], ДНК следует фиксировать на фильтре с помощью шпика при облучении УФ-светом.
- г) Фильтр Hybond гидрофилен, и, следовательно, в отличие от нитроцеллю-

лозного (который приходится смачивать $3\times\text{SSC}$) его не требуется увлажнять перед помещением на гель.

- а) По опыту автора для эффективного сшивания ДНК с найлоновым фильтром важно, чтобы фильтр был абсолютно сухим.
- е) Для облучения ультрафиолетом не обязательно заворачивать фильтр в пленку (Saran Wrap).
- ж) Чтобы откалибровать источник УФ-света, используемый для определенного найлонового фильтра, необходимо осуществить простой контрольный перенос. В лаборатории автора определяли эффективность гибридизации ДНК, перенесенной на Nybond в зависимости от дозы ультрафиолетового света, измеренной дозиметром УФ-излучения. Оптимальная доза при этом составляла $14 \text{ мВт/см}^2/\text{с}$ в течение 4 с.

Судя по имеющимся данным, можно предположить, что в случае переноса под действием капиллярных сил при высокой ионной силе [4] различные найлоновые фильтры мало различаются по эффективности гибридизации ДНК. Этот факт может оказаться полезным при калибровке источников УФ-света вне зависимости от типа фильтра — достаточно лишь иметь дозиметр! Если дозиметр отсутствует, калибровку можно осуществить следующим образом:

1) Проводят электрофорез и переносят на найлоновый фильтр до 10 аликвот, содержащих по 1 нг рестрицированной ДНК, для которой приготовлена гомологичная проба. Следует отметить расположение каждой дорожки таким образом, чтобы отдельные зоны ДНК можно было облучать по отдельности.

2) Помещают источник УФ-света (например, лампу Phillips TUV, 15 Вт) на определенном расстоянии, а под ним на бумаге Whatman 3 ММ располагают фильтр таким образом, чтобы сторона, содержащая ДНК, была бы обращена вверх. Большинство современных хемископов обладают очень высокой мощностью, и некоторые из них могут оказаться неподходящими для получения контролируемых сшивок при облучении УФ-светом. Тем не менее если для облучения используют хемископ, то фильтр должен быть положен на его стекло той стороной, которая несет ДНК.

3) По отдельности облучают каждую дорожку, оставив одну из них необлученной. Для каждой следующей дорожки увеличивают время облучения на 1 мин. В начале целесообразно облучать от 0 до 10 мин с интервалом в 1 мин, но впоследствии могут потребоваться и интервалы в 30 с. Если для облучения используют хемископ и фильтр помещают непосредственно на него, то сроки облучения могут быть гораздо короче.

4) Проводят гибридизацию, как указано в разд. 5.5. Сравнивают сигнал, полученный для каждого интервала облучения, и рассчитывают оптимальную дозу либо в случае необходимости проводят дополнительный эксперимент. Сравнивают сигналы с результатами, полученными на прогревом фильтре, поскольку обработка УФ-светом должна повышать интенсивность сигнала

примерно в пять раз. Если этого не происходит, значит, продолжительность облучения УФ-светом скорее всего определена неверно¹.

5.5. Гибридизация ДНК, перенесенной на мембраны с помощью блоттинга по Саузерну

5.5.1. Общие положения

Теперь одноцепочечную ДНК, связанную с фильтром, можно «испытать» одноцепочечной радиоактивно меченой ДНК пробы, находящейся в растворе. Проба связывается лишь с ДНК, которая обладает по отношению к ней высокой степенью гомологии. Точность взаимодействия или строгость гибридизации (доля неспаренных нуклеотидов, которую допускают данные условия гибридизации) можно изменять, подбирая разные концентрации соли или температуру гибридизации либо используя различные растворы для отмывания [5].

Перед гибридизацией с меченой пробой фильтр предварительно инкубируют в растворе, содержащем разнообразные сложные макромолекулы с длинной цепью, главным образом белки (сухое молоко), а также фрагментированную ДНК из спермы лосося или сельди. Эти молекулы прикрепляются ко всем участкам фильтра, не связанным с ДНК, и, таким образом, препятствуют неспецифическому связыванию при гибридизации меченой ДНК. После гибридизации фильтр тщательно промывают, чтобы удалить всю неспецифически связанную метку, и зоны гибридизации выявляют радиоавтографией.

5.5.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1[1]).
- Кипящая водяная баня (например, Gallencamp).
- Жесткий пластмассовый контейнер с плотно закрывающейся крышкой (например, Gallencamp, № 800058). Чтобы объем гибридизационной смеси был минимальным, коробка должна иметь такую же поверхность, как и гибридизуемый фильтр.
- Термостатируемая качалка с водяной баней на 65 °С с крышкой (например, Gallencamp).

¹ Подбирая оптимальное время «пришивания» фрагментов ДНК к найлоновым мембранам, следует иметь в виду, что оно различается для фрагментов ДНК разной длины. — *Прим. ред. пер.*

- Контейнер (Metal Box plc.) для сухих радиоактивных отходов P^{32} .
- Стакан из пирекса для жидких радиоактивных отходов.
- Защитный экран для работы с радиоактивным материалом.
- Полимерная пленка (Saran Wrap, Dow Chemical Company).
- Фильтровальная бумага Whatman 3 MM.
- Рентгеновская пленка (например, Amersham; Hyperfilm-MP).
- Кассеты для рентгеновской пленки (например, X-ograph Ltd.).
- Фильтровальная бумага с полиэтиленовой подстилкой (Benchkote, Whatman).
- Портативный счетчик радиоактивности (например, Mini-Instruments Ltd.; серия 900).

Растворы

- 20×SSPE (3 М NaCl, 0,2 М $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0,02 М ЭДТА).

На 1 литр:

NaCl	175,3 г
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	31,2 г
0,5 М ЭДТА	40,0 мл.

Растворяют в 900 мл дистиллированной H_2O , доводят pH до 7,7 1,0 М NaOH и доливают до 1 л дистиллированной H_2O .

- Раствор для гибридизации (1,5×SSPE, 0,5% сухое молоко, 1,0% ДСН, 6,0% ПЭГ, 0,1—0,5 мг/мл ДНК из спермы сельди).

На 100 мл:

20×SSPE	7,5 мл
Сухое молоко (например, Cadburys Marvel) ¹⁾	0,5 г
ДСН	1,0 г
ПЭГ (6000 или 8000)	6,0 г

5 мг/мл фрагментированной и денатурированной ДНК из спермы лосося или сельди (Sigma) 2,0—10 мл.

- Раствор А для отмывания (3×SSC, 0,1% ДСН). На 1 литр:

20×SSC	150,0 мл
ДСН	1,0 г.

- Раствор Б (0,5×SSC, 0,1% ДСН). На 1 литр:

20×SSC	25,0 мл
ДСН	1,0 г.

- Радиоактивная проба, меченная с помощью олигонуклеотидной затравки (см. разд. 5.6).

¹⁾ Можно использовать отечественное сухое молоко. Для этого готовят при кипячении 5—10%-ную суспензию, охлаждают, фильтруют и экстрагируют 4—5 раз гексаном для удаления липидов. Полученный раствор используют как десятикратный для гибридизационной смеси. — Прим. ред. пер.

5.5.3. Методика

Предварительная инкубация

1. Наливают в пластмассовую коробку такое количество раствора для гибридизации, чтобы он образовал слой 0,2—0,4 см. Помещают на 10 мин коробку на покачиваемую водяную баню при 65°C, чтобы нагреть раствор.
2. Осторожно помещают фильтр в контейнер для гибридизации.
3. Закрывают крышкой и опять помещают на баню на 1—8 ч.

Гибридизация

1. Заменяют раствор в контейнере на 10—40 мл^{а)} предварительно прогретого (65°C) свежего раствора для гибридизации.
2. Денатурируют меченую пробу для гибридизации^{б)}, проинкубировав ее в течение 5 мин на кипящей водяной бане (чтобы крышка пробирки Эппендорф не откидывалась, следует проколоть в ней отверстие). Помещают пробирку на лед.
3. Надев перчатки и подложив новый лист фильтровальной бумаги с полиэтиленовой подстилкой, вырезают острым скальпелем кусок пленки (Saran Wrap) по размеру контейнера, используя его как шаблон. Продолжая работать на фильтровальной бумаге с полиэтиленовой подстилкой и за защитным экраном, добавляют денатурированную пробу^{в)} к гибридизационной смеси, а затем осторожно покрывают ее поверхность^{г)} пленкой (Saran Wrap), стараясь избежать попадания пузырьков воздуха.
4. Заклеивают контейнер клейкой лентой со значком радиоактивности и помещают на покачиваемую водяную баню при 65°C на 3—16 ч^{д)}.
5. Надев перчатки и подложив фильтровальную бумагу с полиэтиленовой подстилкой, удаляют пленку и выбрасывают ее в контейнер для твердых отходов. Осторожно извлекают фильтры из контейнера для гибридизации, помещают в пластмассовую коробку для отмывания, в которую добавлено 150 мл предварительно прогретого до 65°C раствора А, и ополаскивают. Сливают этот раствор в раковину для радиоактивных отходов либо в специальный стакан из пирекса, чтобы вылить позже в контейнер для отходов. Повторяют эту процедуру трижды^{е)}. Растворы для промывания должны быть предварительно прогреты.
6. Дважды промывают фильтры в течение 30 мин на покачиваемой водяной бане при 65°C, используя каждый раз по 150 мл раствора А для отмывания.

7. Дважды тщательно промывают фильтры по 15 мин в 100 мл раствора Б для отмывания. Для контроля за отмыванием радиоактивности можно использовать переносной счетчик.
8. Высушивают фильтры Hybond-N^ж) на воздухе между листами бумаги Whatman 3 MM, помещают их на новый кусок той же бумаги и заворачивают в пленку (Saran Wrap). Помещают на экспозицию с рентгеновской пленкой^з) на -70°C в специальных кассетах, снабженных усиливающими экранами.

Примечания

- ^а) Во избежание высокого фона очень важно подобрать соответствующую концентрацию пробы. Рекомендуется использовать концентрации менее 0,5 нг/мл. При такой концентрации для 10 нг пробы, образующейся в результате одной стандартной реакции с использованием олигонуклеотидной заправки, потребуется 20 мл гибридационной смеси. Следует заметить, что при такой весьма низкой концентрации необходимо, чтобы проба обладала высокой удельной радиоактивностью ($>5 \times 10^7$) и чтобы гибридизация стимулировалась высокомолекулярными соединениями, например ПЭГ 6000 или 8000 [6].
- ^б) Важно, чтобы ДНК была полностью денатурирована, поскольку двухцепочечная проба не сможет связаться с гомологичными последовательностями на фильтре.
- ^в) Количество радиоактивной метки, используемой при гибридизации, зависит от относительного содержания гомологичных последовательностей ДНК, которые предположительно присутствуют на фильтре. Как правило, достаточно 10^6 имп/мин/мкг ДНК, однако для выявления последовательностей одной копии гена в геномах растений может потребоваться проба с удельной активностью порядка 10^9 имп/мин/мкг ДНК.
- ^г) Необходимо следить, чтобы во время гибридизации или отмывания фильтр не пересыхал. Это может произойти, если гибридизация и отмывание проводятся в недостаточно герметичной коробке. Данные стадии лучше проводить в запаянном полиэтиленовом пакете, либо в специально сконструированной для этих целей гибридационной камере из оргстекла.
- ^д) Продолжительность гибридизации зависит от комплексности связанной с фильтром ДНК, а также от удельной активности и концентрации пробы. Для гибридизации с полосой клонированного фрагмента, содержащего 100 нг ДНК, требуется инкубация в течение всего лишь 2—4 ч при стандартных условиях и активности пробы $1-5 \times 10^6$ имп/мин с удельной активностью 10^9 имп/мин/мкг. В зависимости от комплексности для гибридизации тотальной ДНК эукариот может потребоваться 12—16 ч.
- ^е) Условия отмывания зависят от требуемой строгости гибридизации. Описанные в данной методике условия подходят для относительно высокой точности спаривания оснований. Строгости можно повысить, повышая температуру растворов для отмывания и/или снижая концентрацию ДСН.
- ^ж) Если фильтр предназначен для повторного использования, он не должен пересыхать. С него удаляют пробу следующим образом:
 - 1) Инкубируют фильтр при 45°C в течение 30 мин в 100 мл 0,4 М NaOH.
 - 2) Переносят в 100 мл $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1% ДСН, 0,2 М трис-HCl, pH 7,5, и затем инкубируют при 45°C в течение 30 мин.
 - 3) Проводят радиоавтографию фильтра, чтобы убедиться в отсутствии пробы.

- 4) Как обычно, предварительно инкубируют фильтр либо хранят при 4 °С завернутым в пленку.
- 5) Известны разнообразны́е виды рентгеновской пленки. Amersham Hyperfilm-MP — одна из самых чувствительных и обеспечивает хороший контраст¹.

5.6. Мечение препаратов для гибридизации с помощью олигонуклеотидной затравки

5.6.1. Общие положения

Мечение с использованием в качестве затравки олигонуклеотидов [2] позволяет получить комплементарные пробы ДНК, обладающие высокой радиоактивностью, и представляет собой значительный шаг вперед по сравнению с методом *ник*-трансляции. Принцип усовершенствования состоит в использовании в качестве субстрата при мечении очищенного фрагмента ДНК, что удобно в нескольких отношениях:

- Можно приготовить пробу, комплементарную определенной области клонированного фрагмента ДНК, например гомологичную 5'- или 3'-концу.
- Можно проводить отбор библиотеки кДНК в случае, когда проба не должна содержать последовательностей вектора.
- Можно приготовить пробу, обладающую высокой активностью, что возможно лишь в случае, если помечена только вставка, а не вектор.

При мечении с использованием олигонуклеотидной затравки, как и в случае других методов получения проб с высокой удельной активностью, используют фрагменты ДНК, отделенные от вектора с помощью обработки рестриктазами и электрофоретического разделения в агарозе. Однако большое преимущество мечения с использованием олигонуклеотидов перед другими методами заключается в том, что перед мечением ДНК не требуется элюировать из агарозного геля. Вместо этого полосу, содержащую известное количество нанесенной на гель ДНК, локализуют с помощью хемискапа и вырезают из геля. Кусочек геля взвешивают, рассчитывают в нем количество ДНК и аликвоту, в которой содержится только 10 нг ДНК, используют непосредственно в реакции. Перед мечением кусочек агарозы расплавляют на кипящей водяной бане (при этом ДНК одновременно денатурирует и выходит из агарозы), затем его охлаждают до 37 °С и аликвоту, содержащую 10 нг ДНК, вно-

¹ Наиболее чувствительная отечественная экранная пленка — РМ-В; практически аналогичной чувствительностью обладают экранные пленки РМ-1, РТ-2 и НS-11 (ГДР). — *Прим. ред. пер.*

сят в реакционную смесь. Реакционная смесь содержит гексамеры дезоксирибонуклеотидов (олигомеры) со случайными последовательностями. Эти олигонуклеотиды связываются с одноцепочечной ДНК пробы в областях гомологии и служат затравками для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Этот фермент полимеризует дезоксирибонуклеотиды, присутствующие в реакционной смеси. Поскольку один из этих дезоксирибонуклеотидов помечен ^{32}P , то проба оказывается высоко меченной. Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 4—5 ч (можно также оставить на ночь). Реакцию останавливают простым по составу раствором и смесь кипятят, чтобы образовались одноцепочечные молекулы, готовые для добавления в гибридизационную смесь.

5.6.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Оборудование, необходимое для обработки ДНК рестриктазами (разд. 5.2) и для электрофореза (разд. 5.3.1).
- Агароза с низкой температурой затвердевания (например, Miles Scientific; SeaPlaque).
- Кипящая водяная баня.
- Водяная баня 37°C .

Растворы

- Буфер для мечения (OLB, от англ. oligolabelling buffer) готовят при смешивании трех отдельных растворов:

Раствор А:

2 М трис- HCl , pH 8,0	625 мкл (разд. 6.7.2.1)	
5 М MgCl_2	25 мкл	
Дистиллированная H_2O	350 мкл	
2-МЭ	18 мкл	
dATP	5 мкл	} Растворяют каждый нуклеотид по отдельности в 3 мМ трис- HCl (pH 7,0), 0,2 М ЭДТА в концентрации 0,1 М. Раствор следует хра-
dTTP	5 мкл	
dGTP	5 мкл	
Pharmacia		

нить при
—20 °С.

Раствор В: (2 М HEPES, pH 6,6). *На 100 мл:* растворяют 47,66 сухого HEPES в 75 мл дистиллированной H₂O, доводят pH до 6,6 NaOH, доливают до 100 мл дистиллированной H₂O. Хранят при 4 °С.

Раствор С: гексадезоксирибонуклеотиды (Pharmacia, кат. № 27-2166-01) тщательно суспендируют (полностью они не растворяются!) в 3 М трис-HCl, 0,2 М ЭДТА (pH 7,0) до поглощения OD₂₆₀=90 ед./мл и хранят при —20 °С. Для приготовления OLB смешивают растворы А, В и С в соотношении 2:5:3. OLB, хранящийся при —20 °С, остается стабильным по крайней мере в течение 3 мес при постоянном замораживании-оттаивании.

— БСА: 10 мг/мл (препарат, свободный от ДНКаз, кат. № 27-8915-01). Хранят при 4 °С.

— dCTP (Amersham PB10205, 3000 Ки/ммоль, 10 МКи/мл).

— Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I: 1 ед./мкл, кат. № 27-0928-01).

— Стоп-раствор (20 мМ NaCl; 20 мМ трис-HCl, pH 7,4; 2 мМ ЭДТА; 0,25%-ный ДСН).

На 20 мл:

5,0 М NaCl	80,0 мкл
2,0 М трис-HCl, pH 7,4	200,0 мкл
0,5 М ЭДТА	80,0 мкл
10%-ный ДСН	0,5 мл.

— Стерильная дистиллированная H₂O.

— ДНК плазмиды, несущей нужный фрагмент ДНК-пробы.

Примечание: набор для мечения с помощью олигонуклеотидной затравки, содержащий те же реагенты, поставляется фирмой Amersham.

5.6.3. Методика

Приготовление пробы

В качестве примера мы приводим получение гипотетической ДНК-пробы, клонированной в составе небольшого вектора. Длина вектора составляет 2 т. п. н., а длина вставки, используемой в качестве пробы,—1 т. п. н. Таким образом, вставка составляет 1/3 длины рекомбинантной плазмиды.

1. Обрабатывают 1,5 мкг плазмиды такой рестриктазой, которая вырезает только вставку (см. подробнее разд. 5.2).
2. Разделяют расщепленную ДНК в геле 0,6%-ной агарозы, содержащей БЭ (разд. 5.3), обеспечив хорошее разделение

вставки и вектора. Разделение можно контролировать с помощью переносной УФ-лампы.

3. Аккуратно вырезают зону из геля, помещенного на хемископ, и удаляют избыток агарозы.

Примечание: Следует надеть защитную маску, закрывающую все лицо.

4. Переносят кусочек геля в предварительно взвешенную центрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой, взвешивают ее и определяют вес кусочка геля.
5. Такой кусочек агарозы содержит достаточное для нескольких реакций количество ДНК-пробы. Следовательно, необходимо вычислить объем агарозы, используемый для каждого мечения:

Вес кусочка агарозы	100 мг
Плотность геля	1,0 г/мл
Количество вставки	0,5 мкг (1/3 от 1,5 мкг) = = 500 нг (в каждой реакции используют 10 нг).

Таким образом, в кусочке агарозы весом 100 мг содержится такое количество ДНК вставки, которое достаточно для проведения $\frac{500}{10} = 50$ реакций. Следовательно, объем агарозы, используемый в одной реакции = $\frac{100}{50} = 2,0$ мкл. Смесь ДНК вставки и агарозы будем в дальнейшем называть исходной пробой.

Реакция мечения

Одну и ту же исходную пробу можно использовать несколько раз без снижения эффективности мечения следующим образом:

1. Прогревают исходную пробу в течение 5 мин на кипящей водяной бане^{a)}.
2. Переносят пробирку на 5—10 мин в водяную баню на 37 °С. За это время смешивают следующие вещества в пробирке Эппендорф объемом 1,5 мл:

Буфер OLB для мечения	3,0 мкл
БСА	0,6 мкл
³² P-dCTP	1,5 мкл
Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I	0,6 мкл.

Следует убедиться, что все компоненты смеси находятся на дне пробирки (при необходимости центрифугируют) и добавить ДНК.

Исходная проба 2,0 мкл (10 нг).

Доводят до 15 мкл стерильной дистиллированной H_2O (7,3 мкл).

3. Быстро перемешивают встряхиванием (избегая избыточного вспенивания) и центрифугируют в течение 2 с, чтобы собрать капли на дне пробирки. Оставшуюся исходную пробу помещают до следующего раза в морозильник.
4. Помещают пробирку в надписанный свинцовый контейнер и затем инкубируют при комнатной температуре в течение 5 ч^{б)}.
5. Останавливают реакцию, добавив 85 мкл стоп-раствора.
6. Отбирают аликвоту (1—5 мкл) для измерения включения метки в пробу (приложение 5 [III]).
7. Кипятят пробу (5 мин), быстро охлаждают на льду и до-бавляют^{в)} в гибридизационную смесь.

Примечания

- а) Это приводит к расплавлению агарозы, высвобождению и денатурации ДНК.
- б) Реакция выходит на плато примерно через 4—5 ч, однако, если это удобно, можно оставить на ночь.
- в) Мечение происходит весьма эффективно, и, таким образом, в отличие от ник-трансляции нет необходимости избавляться от ^{32}P -dCTP перед внесением ДНК-пробы в гибридизационную смесь. Хотя реакция хорошо воспроизводится, часто необходимо измерить включение ^{32}P -dCTP в ДНК-пробу, как описано в приложении 5 [III]. В результате удельная активность превышает 10^9 имп/мин/мкг.

Приложение 5 [I]

Буферы для рестриктаз

Десятикратный буфер для *EcoRI*:

1,00 М трис-HCl

0,50 М NaCl

0,10 М $MgCl_2$

pH 7,5.

Десятикратный буфер для *HindIII*:

0,10 М трис-HCl

0,50 М NaCl

0,10 М $MgCl_2$

0,14 М дитиотреитол (ДТТ)

pH 7,5.

Приложение 5 [II]

Концевое мечение маркеров, полученных на основе ДНК фага λ

1. В стерильной пробирке Эппендорф смешивают следующие реагенты:

ДНК фага λ , обработанная <i>Hind</i> III	1,0 мкг	см. разд. 5.3 примечание 3)
Буфер АВ ^{a)}	3,0 мкл	} см. разд. 5.6.2
БСА (10 мкг/мл)	0,6 мкл	
³² P-dCTP	1,0 мкл	
Фрагмент Кленова	0,2 мкл	
Дистиллированная H ₂ O	до 15,0 мкл	

2. Помещают пробирку в надписанный свинцовый контейнер и инкубируют 5 ч.
3. Останавливают реакцию, добавив 85 мкл стоп-раствора (разд. 5.6.2).
4. Отбирают аликвоту (1—5 мкл) для измерения включения метки в пробу (приложение 5[III]).
Примечание: ДНК фага λ ни до, ни после мечения нельзя кипятить.
5. Наносят 5×10^4 имп/мин на одну дорожку агарозного геля.
6. Для повышения стабильности следует предварительно экстрагировать маркеры фенолом, как описано в разд. 1.8.3 (стадии 10—16).

Примечание

- a) Получают, смешивая растворы А и В для мечения в соотношении 2:5.

Приложение 5 [III]

Определение включения метки в ДНК

Способ А

1. Наносят определенный объем (до 10 мкл) образца в центр стеклянного фильтра GF/C (Whatman) диаметром 2,4 см. При использовании олигонуклеотидов (разд. 5.6) 15 мкл реакционной смеси доводят до 100 мкл, добавляя 85 мкл стоп-раствора (или раствора для гибридизации), и 1 мкл наносят на фильтр.
2. Переносят пипеткой такой же объем (1 мкл для ДНК, меченной с использованием олигонуклеотидов) образца в пробирку Эппендорф, содержащую 500 мкл раствора ДНК из спермы лосося или сельди (500 мкг/мл в 20 мМ ЭДТА).

Добавляют 125 мкл 50%-ной ТХУ, охлажденной до 0°C, перемешивают и охлаждают на льду в течение 5 мин.

3. Собирают осадок фильтрованием через GF/C на специальной установке под вакуумом. Дважды промывают осадок 5 мл 10%-ной ТХУ, охлажденной до 0°C, и затем дважды 5 мл 100%-ного этанола.
4. Высушивают оба фильтра и измеряют радиоактивность в жидком сцинтилляторе. Непромытый фильтр позволяет определить внесенную радиоактивность, а промытый фильтр — включившуюся метку.
5. Вычисляют процент включения и удельную активность (имп/мин/мкг) ДНК пробы.

Способ Б

1. Наносят 1—2 мкл в центр каждого из двух бумажных дисков Whatman DE-81 диаметром 2,4 см.
2. Промывают один из фильтров пять раз в 0,5 М Na_2HPO_4 (5 мин на промывание), затем дважды дистиллированной H_2O (1 мин на промывание) и дважды в 95%-ном этаноле (1 мин на промывание).
3. Далее следуют способу А (стадии 4 и 5).

Литература

1. Bittner M., Kupferer P., Morris C. F. (1980) Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzylloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* **102**, 459—71.
2. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1984) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266—7.
3. Helling R. B., Goodman H. M., Boyer H. W. (1974) Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophage and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* **14**, 1235—41.
4. Khandjian E. W. (1987) Optimised hybridisation of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Biotechnology* **5**, 165—7.
5. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
6. Renz M., Kurz C. (1984) A colorimetric method for DNA hybridisation *Nucl. Acids Res.* **12**, 3435—44.
7. Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503—17.
8. Stellwag E. J., Dahlberg A. E. (1980) Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto diazobenzylloxymethyl (DBM)-paper. *Nucl. Acids Res.* **8**, 299—317.
9. Wahl G. M., Stern M., Stark G. R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to DBM paper and rapid hybridisation using dextran sulphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3683—7.

Анализ организации и экспрессии генов растений

Р. Скотт, Дж. Дрейпер, Р. Джефферсон, Г. Дьюри, Л. Джэкоб

6.1. Введение

Методы генетической трансформации позволяют не только вводить новый генетический материал в культурные растения, но также идентифицировать и изучать последовательности нуклеотидов, контролирующие экспрессию генов. При разработке любого проекта по генетической инженерии для получения контролируемой экспрессии в нужных тканях на соответствующей стадии жизненного цикла следует обращать самое серьезное внимание на манипуляции с изучаемыми генами. Выделение генов, обладающих высоким уровнем экспрессии в определенных органах различных растений на известной стадии жизненного цикла, значительно облегчает идентификацию промоторов, специфически активных в этих тканях и органах, а также позволяет проводить фундаментальные исследования экспрессии генов в онтогенезе. Таким образом, определены и используются в настоящее время для получения трансгенных растений нуклеотидные последовательности, которые усиливают или подавляют экспрессию генов в зависимости от воздействий окружающей среды (например, света или стресса). В данной главе описываются некоторые основные свойства генов растений, и, кроме того, изложены некоторые подходы к изучению организации перенесенных генов методом блоттинг-гибридизации по Саузерну (разд. 6.2) и экспрессии генов в трансгенных растениях.

В большинстве разделов аналитические методики разбираются на примере определенных последовательностей нуклеотидов и белков. Однако большинство методов можно оптимизировать для изучения ряда других генных конструкций и продуктов определенных генов.

6.1.1. Принцип организации генов растений

Ядерные гены растений состоят из различных участков, функция которых изучена лишь недавно (рис. 6.1). На 5'-конце всех генов расположена промоторная область, которая участвует в инициации транскрипции. Внутри этого участка в положении -70 и -30 от точки начала транскрипции (сайт CAP) расположены соответственно так называемые блоки

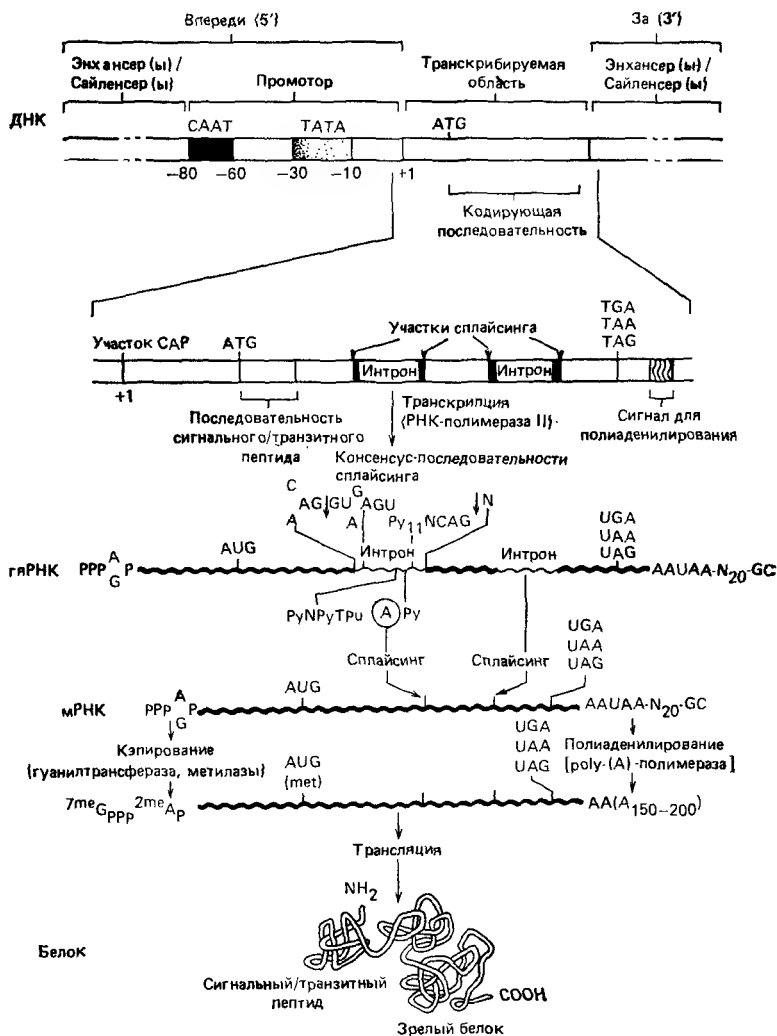


Рис. 6.1. Структура и экспрессия ядерных генов растений.

СААТ и ТАТА, участвующие в связывании РНК-полимеразы II. Для некоторых генов описаны и другие участки, расположенные до промотора (в 5'-направлении) и участвующие в регуляции экспрессии генов в зависимости от условий окружающей среды или определенной стадии развития. Например, недавно сообщалось [39] о включении или выключении транскрипции, вызываемых светом или темнотой, а также о других более спе-

цифических механизмах контроля, зависящих от света (например, существуют последовательности, изменяющие ответную реакцию фитохрома). За сайтом CAP (в 3'-направлении) расположен нетранскрибируемый участок, предшествующий кодону инициации трансляции (ATG или AUG в мРНК), который кодирует аминокислоту метионин. Внутри транслируемой области могут находиться один или несколько участков, называемых интронами, которые не обнаруживаются в зрелой информационной РНК. Конец транслируемой области транскрипта определяется стоп-кодом TAA, TAG либо TGA (соответственно UAG, UAA или UGA в мРНК), за которым расположен нетранслируемый участок, и затем — на 3'-конце — сигнал для полиаденилирования, характеризующийся высоким содержанием АТ-пар и обычно представляющий собой последовательность G/AATAA(AA).

6.1.2. Строение мРНК

Информационная РНК (мРНК), зрелая молекула цитоплазматической РНК, готовая для трансляции, образуется из так называемой гетерогенной ядерной РНК (гяРНК), которая считывается с ДНК ферментом РНК-полимеразой II (рис. 6.1). Вследствие наличия интронов и внутриядерного расщепления определенных последовательностей гяРНК может содержать до 75% последовательностей, не входящих в состав зрелой мРНК. Последовательности интронов вырезаются, и концы мРНК соединяются в строго определенных точках, окруженных последовательностями GU с 5'-конца и AG с 3'-конца. К другим модификациям гяРНК при ее превращении в мРНК, готовой к переносу в цитоплазму, относятся добавление кэпа, состоящего из остатка 7-метилгуанозина, присоединенного к 5'-концу молекулы РНК 5'-5' трифосфатной связью, а также присоединение к ее 3'-концу цепочки poly(A), в которую может входить до 250 остатков. Полагают, что кэп играет важную роль в инициации синтеза белка. Poly(A) может способствовать повышению устойчивости молекул РНК к деградации в цитоплазме.

6.1.3. Перенос продуктов генов в клетке

Многие белки, синтезируемые в цитоплазме, предназначены для других областей клетки. Например, запасные белки кукурузы и ячменя (зеин и гордени) заключены в пузырьки эндоплазматического ретикулума (ЭР). Малая субъединица (МС) рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О) и хлорофилл а/б-связывающий белок (Cab) кодируются в ядре,

но локализованы в хлоропластах: первый в области стромы, второй — в гранах. Некоторые белки, например экстенсин, секретируются в клеточную стенку. Такие белки содержат N-концевую (5') пептидную последовательность, которая определяет внутри- или внеклеточное перемещение (рис. 6.1). Затем часто в процессе переноса эта последовательность отщепляется, и образуется зрелый белок. В случае белков, предназначенных для переноса через мембрану, например в строму хлоропластов, концевой пептид называют транзитным, а в случае переноса в мембрану — сигнальным. Эти пептиды обладают различными механизмами действия (разд. 6.5).

6.1.4. Использование генетической трансформации для изучения экспрессии генов растений

Использование основных приемов работы с рекомбинантной ДНК и методик анализа белков и нуклеиновых кислот позволяет клонировать гены и изучать их организацию (блоттинг-гибридизация по Саузерну), строение мРНК (нозерн-блоттинг), а также следить за уровнем экспрессии генов в различных условиях окружающей среды и даже в процессе развития. Например, в некоторых случаях уровни транскрипции гена определяют методом дот-блот-гибридизации выделенной РНК (разд. 6.3). Более подробные качественные исследования транскрипционной активности осуществляют с помощью нозерн-блоттинга (приложение 6 [1]). 5'- и 3'-концы транскриптов определяют, используя S1-картирование [2, 56]. Однако такие методы анализа позволяют установить только строение транскрибируемой области или гена, а также механизмы процессинга транскриптов и их трансляции. Функцию любых участков вне транскрибируемой последовательности в некоторой степени можно изучать, сравнивая гены, обладающие сходными механизмами регуляции. При этом большинство предположений о воздействии на экспрессию гена остаются исключительно в области догадок. В этом случае генетическая трансформация предоставляет исследователю, работающему с растениями, уникальную возможность непосредственно отвечать на фундаментальные вопросы, касающиеся регуляторной функции последовательностей, расположенных как в непосредственной близости, так и на некотором расстоянии от 5'- и 3'-концов транскрибируемого гена. Используя разнообразные методы мутагенеза *in vitro* и технологию рекомбинантных ДНК, удастся модифицировать клонированные гены и затем после введения мутантного гена путем генетической трансформации обратно в растения анализировать влияние изменения этого гена на его экспрессию. Подобные методики способствовали изучению нуклеотидных

последовательностей, расположенных перед 5'-концом некоторых генов, которые, как предполагалось, определенным образом регулируют экспрессию генов, в особенности уровень транскрипции.

6.1.5. Использование трансгенных растений для изучения последовательностей, регулирующих транскрипцию

Функции коротких регуляторных последовательностей, о которых упоминалось выше (блоки ТАТА и СААТ), были определены с помощью мутагенеза. Например, при изменении расстояния между блоком ТАТА и сайтом САР, менялось положение точки инициации транскрипции [30]. Эти данные позволяют предположить, что блок ТАТА некоторым образом определяет сайт начала транскрипции. Данные других экспериментов указывают на то, что блок СААТ, вероятно, оказывает определенный эффект на уровень транскрипции. С помощью делеционного мутагенеза последовательностей, расположенных в 5'-направлении от начала транскрипции генов малой субъединицы (МС) РБФК/О и *Сав* [9, 25, 36, 39], исследовали и другие участки. Они переключают гены под действием света/темноты с помощью фитохромов (фоторецепторов растений) и обеспечивают органоспецифическую регуляцию. В этих экспериментах использовали конструкции, состоящие из последовательностей, расположенных перед 5'-концом различных генов, которые были соединены либо со своим же геном, либо с «индикаторными» генами (см. ниже), такими, как ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (*cat*) либо неомизинфосфотрансферазы-II (*npt-II*), и экспрессировались в трансгенных растениях петунии или табака. Некоторые из этих последовательностей, кроме того, сохраняли свою тканеспецифичность, которая в норме связана с экспрессией этого гена, например, различные уровни транскрипции в листе, стебле и корне. Для получения трансгенных растений, которые синтезируют необходимый продукт контролируемым образом в определенных органах, полное понимание природы регуляторных последовательностей особенно важно.

6.1.6. Изучение регуляторных последовательностей с помощью индикаторных генов

Определение содержания или активности продуктов, кодируемых перенесенным геном, представляет собой наиболее прямой способ изучения экспрессии чужеродных генов в трансформированных тканях растений. Многие промоторы и предполагаемые регуляторные последовательности изучали путем со-

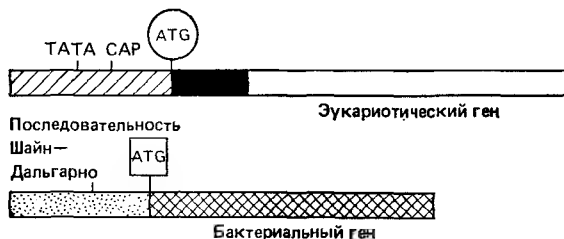
единения с индикаторным геном. Индикаторный ген обычно представляет собой последовательность, кодирующую бактериальные ферменты, для которых имеются простые и чувствительные методы определения и чья активность в тканях растений в норме отсутствует (табл. 2.1). Чаще других используют гены, кодирующие октопин- и нопалинсинтазы (из *T-DНК A. tumefaciens*), CAT, NPT-II и GUS.

Изучаемую промоторную последовательность можно соединить с индикаторным геном путем транскрипционного либо трансляционного слияния. Для того чтобы получить транскрипционное слияние, область промотора индикаторного гена вырезают как можно ближе к ATG (кодон инициации трансляции), и затем этот ген непосредственно соединяют с изучаемым промотором. Если блок ТАТА нового промотора оказывается на соответствующем расстоянии (30—40 п.н.) от сайта ATG, то образуется химерный транскрипт, способный к нормальной трансляции с образованием фермента дикого типа (рис. 6.2). Если же необходимо получить трансляционное слияние, то ATG «промоторной последовательности» вместе с несколькими кодонами гена, который он обычно регулирует, соединяют с индикаторным геном, у которого в этом случае отсутствует свой собственный кодон ATG. Последний подход связан с двумя основными трудностями. Во-первых, соединение генов должно быть осуществлено таким образом, чтобы в транскрипте не происходило сдвигов рамки считывания и не возникали стоп-кодоны трансляции, что может приводить к образованию бессмысленных полипептидов или коротких фрагментов белка соответственно. Во-вторых, хотя и возможно обеспечить слияние таким образом, чтобы следующий за ATG кодон представлял собой первый кодон индикаторного гена, это может потребовать значительных усилий. Таким образом, в большинстве случаев на N-конце гена растения подбирается (или конструируется) подходящий рестриктивный сайт, который обеспечивает трансляционное слияние без нарушения рамки считывания. В таком случае индикаторный ген должен функционировать более или менее нормально, причем к N-концу кодируемого им белка добавляется несколько лишних аминокислот. Если таким образом использовать CAT и NPT-II, то лишние аминокислоты (см. например, [46]) не оказывают существенного влияния на активность ферментов.

Индикаторные гены использовались во многих работах по изучению экспрессии генов растений, находящихся под контролем клонированных 5'-последовательностей или нуклеотидных последовательностей, кодирующих транзитный пептид (разд. 6.9). Такие химерные гены обладают рядом преимуществ: продукты их трансляции часто можно использовать в

экспериментах по трансформации в качестве как селективных, так и индикаторных маркеров (гл. 1—3), и, располагая радиоактивным субстратом, их можно обнаружить уже при весьма низких концентрациях. Таким образом, результаты количественных измерений в экспериментах по изучению последовательностей, вероятно, будут отражать контроль экспрессии гена в

А Исходные гены



Б Слияние генов с последующей транскрипцией и трансляцией

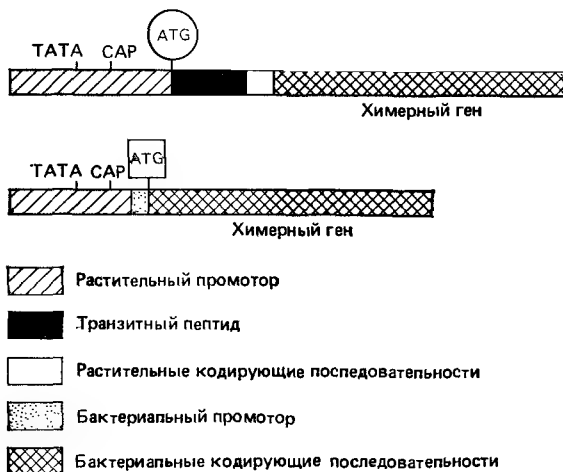


Рис. 6.2. Слияние промоторных областей генов растений с индикаторными генами бактерий.

процессе развития или при изменении условий окружающей среды. Более того, в трансгенных растениях отпадает необходимость в разграничении экспрессии чужеродного и хозяйского генов.

Хотя измерение ферментативной активности (например, САТ) позволяет оценить уровень транскрипции соответствующих генов, оно не всегда в точности соответствует последней.

Например, если матрица очень стабильна, продукт накапливается в больших количествах даже без повышения уровня транскрипции. Если изучаемый ген не обладает ферментативной активностью, можно получить соответствующие антитела и выявить экспрессию гена с помощью вестерн-блоттинга либо других стандартных иммунологических методов.

Описанные выше разнообразные методики использовались для изучения экспрессии генов в трансформированных каллусах, растениях, полученных из них, и в F_1 -поколении трансформированных растений ряда видов. В данной главе будут рассмотрены некоторые из применяемых в настоящее время методик, предназначенных для изучения строения и экспрессии генов.

6.2. Изучение организации Т-ДНК методом блоттинг-гибридизации по Саузерну

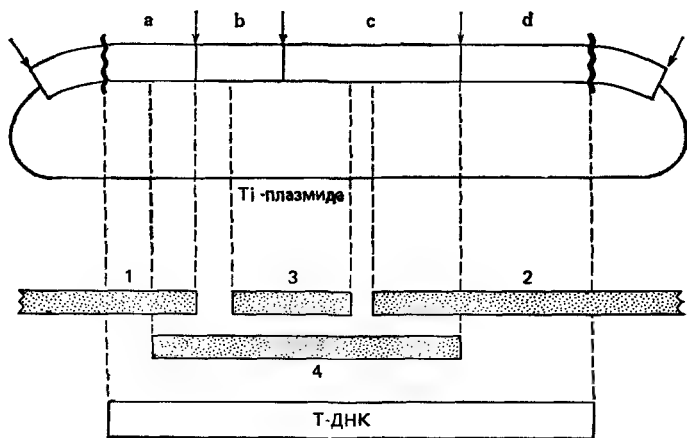
6.2.1. Общие положения

Для первоначального изучения чужеродной ДНК, встроенной в геном растения путем трансформации с помощью агробактерий, лучше всего использовать блоттинг-гибридизацию по Саузерну, как описано в гл. 5. Таким образом можно получить следующие данные:

- о присутствии переносимого гена;
- о копийности трансформируемого гена, а также о том, расположены ли множественные вставки тандемно или рассеяны по геному;
- о стабильности такой ДНК в поколении F_1 трансформированных растений.

Организацию ДНК в трансформантах, полученных путем трансфекции ДНК [метод DMGT: введение ДНК, которое стимулируется ПЭГ (разд. 3.2), электропорация (разд. 3.3) и микроинъекция (разд. 3.4)], гораздо труднее анализировать, поскольку в хромосомы включаются неизвестные последовательности. В результате применения данных методов в геном встраиваются фрагменты векторов, целые векторы либо конкатемеры векторов и/или самой ДНК переносимых генов. Трансформанты отбирают по доминантному маркерному гену, а переносимый изучаемый ген обычно тесно связан с вектором, и, таким образом, его перенос вполне вероятен. Блоттинг-гибридизация по Саузерну в таком случае может лишь подтвердить факт переноса изучаемого гена в трансформант. Более полное понимание организации изучаемой чужеродной ДНК достигается лишь в результате определения последовательности нуклеотидов.

А. Ti-плазмида



Повтор длиной 25 п.н.
Сайт узнавания *Eco* RI

1-я проба, гомологичная
левому участку
2-я проба, гомологичная
правому участку
3,4-я пробы, гомологичные
среднему участку

Б. Одиночная вставка

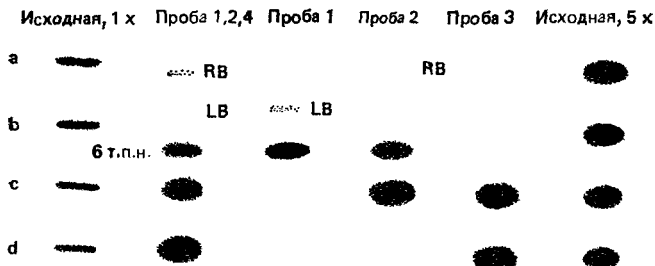
	Исходная, 1 х	Пробы 1,2,4	Проба 1	Проба 2	Исходная, 5 х
a		RB		RB	
b		LB	LB		
c					
d					

Результат — одна копия вставки полной длины

Методы выделения ДНК и блоттинг-гибридизация по Саузеру уже описаны соответственно в гл. 4 и 5. В первой части данного раздела изложен общий подход к интерпретации данных блоттинг-гибридизации по Саузеру. Затем приведен конкретный пример анализа результатов блоттинг-гибридизации по Саузеру для трансгенных растений моркови. Важно отметить, что все подробности, касающиеся выделения ДНК, ее обработки рестриктазами, электрофореза в агарозном геле, переноса по Саузеру, радиоактивного мечения и гибридизации даны в гл. 4 и 5.

В. Несколько одиночных вставок

Результат — три отдельные вставки в геном. Выявляются по сегрегации

Г. Тандемные вставки

Результат — большой фрагмент размером 6 т.п.н. выявляется при гибридизации с пробями, гомологичными левому и правому участкам, но не среднему. Это позволяет предположить, что фрагмент составной. В нем может быть пять тандемно встроенных копий Т-ДНК.

Рис. 6.3. Общая схема анализа организации Т-ДНК. RB и LB — правый и левый повторы длиной 25 п. н.

6.2.2. Организация последовательностей чужеродной ДНК в тканях растений

Данный пример относится к генам, переносимым с помощью Ti-плазмидной векторной системы *A. tumefaciens*. Впервые организация Т-ДНК в трансформированных тканях была описана Томашовым и сотрудниками [53]. Для того чтобы получить полную картину организации перенесенной ДНК, следует обработать ее несколькими рестриктазами и нанести на гель для последующего анализа по Саузерну с помощью ряда перекрывающихся проб. На гель следует нанести исходную Т-ДНК, содержащую фрагменты Т-ДНК, вырезанные из векторов, к которым добавлена ДНК из спермы лосося (или другая неспеци-

фическая ДНК), таким образом, чтобы они соответствовали определенному содержанию Т-ДНК в геноме растения. Эти дорожки необходимы для определения содержания обладающей той же подвижностью Т-ДНК в изучаемом препарате и копийности полученных при рестрикции фрагментов Т-ДНК в геноме.

Суммируя результаты работ последних нескольких лет, образующиеся в результате рестрикции фрагменты можно отнести по крайней мере к четырем группам (рис. 6.3).

Внутренние фрагменты (I)

Фрагменты, присутствующие в ДНК трансформированного растения, которые полностью гомологичны фрагментам ДНК плазмидного вектора, получаемым при обработке той же нуклеазой. Внутренние фрагменты в геле мигрируют аналогично соответствующим фрагментам исходной ДНК плазмидного вектора и при одинаковой копийности дают на радиоавтографы зоны с такой же интенсивностью.

Пограничные фрагменты (B)

Фрагменты, содержащие концы вставок перенесенной ДНК и обладающие вследствие этого лишь частичной гомологией с рестрикционным фрагментом векторной плазмиды. По определению пограничные фрагменты содержат ДНК как вектора, так и растения, а их размер зависит от расстояния ближайшего к границе сайта узнавания используемой рестриктазы внутри перенесенной ДНК до первого такого сайта в окружающей ее ДНК растения. Обычно пограничные фрагменты в геле обладают иной подвижностью, чем фрагменты исходной ДНК плазмидного вектора, обработанные той же эндонуклеазой. При одинаковой подвижности, интенсивность полосы будет ниже, чем ожидается для внутреннего фрагмента, поскольку пограничный фрагмент состоит не только из последовательностей ДНК вектора.

Составные фрагменты (C)

Фрагменты, гомологичные как правому, так и левому концу Т-ДНК. Такие фрагменты, вероятно, образуются вследствие тандемных вставок (Т), которые, как полагают, возникают в результате предшествующей встраиванию конкатемеризации Т-ДНК. Вместе с тем составные фрагменты могут образоваться при встраивании отдельных фрагментов Т-ДНК очень близко друг к другу и в одной и той же ориентации либо возникают в результате амплификации после встраивания. Тандемные вставки чаще образуются при использовании бинарных векторов. Перевернутые тандемные вставки также образуют составные

фрагменты, в которых отмечается гомология только с одним концом Т-ДНК.

Перестроенные фрагменты (R)

Фрагменты, возникающие, по всей видимости, вследствие перестройки Т-ДНК в результате неправильного встраивания или при ее последующей перестройке. Перестроенные фрагменты гомологичны как внутренним, так и пограничным областям Т-ДНК, однако их сайты рестрикции могут быть непредсказуемы.

Анализ числа пограничных и составных фрагментов можно использовать для определения содержания отдельных вставок Т-ДНК (число вставок) в трансформированной ткани. «Копийность» (т. е. общая копияность всех типов вставок Т-ДНК в трансформированной ткани) определяют, сравнивая интенсивность внутренних фрагментов с полосами исходной Т-ДНК на радиоавтографах.

1. Отмечают каждую полосу на радиоавтографе, которая обладает той же подвижностью, что и исходная Т-ДНК. Определяют, какому разведению исходной Т-ДНК соответствуют полосы, и вычисляют число копий на гаплоидный геном для каждой из полос. Данные полосы могут оказаться внутренними фрагментами, что должно быть проверено либо путем обработки другими рестриктазами, либо путем получения перекрывающихся проб.
2. Отмечают на радиоавтографе каждую полосу, которая имеет отличную от исходной Т-ДНК подвижность. Если таких полос несколько и копияность внутренних фрагментов более 1 на геном, то в этом случае полосы, обладающие иной, чем внутренние фрагменты, подвижностью, могут оказаться либо а) пограничными фрагментами, либо б) составными фрагментами.
 - а) Если полосы очень слабые, то скорее всего это пограничные последовательности, что проверяют гибридизацией с правым или левым концом (рис. 6.3, А). Очевидно, что пограничные последовательности должны гибридизоваться с одним из концов. В случае простых вставок, число фрагментов, содержащих левую или правую границу, должно равняться копияности вставок (рис. 6.3, Б). Если это не так (т. е. неидентифицированных полос меньше, чем полос, соответствующих внутренним фрагментам!), то эти полосы могут содержать составные фрагменты (см. ниже пункт б).
 - б) Если полосы дают сильный сигнал, а копияность внутренних фрагментов больше 1, то эти полосы, вероятно, содержат составные фрагменты (рис. 6.3, Г). В таком случае интенсивность составных фрагментов должна приближаться

к интенсивности внутренних фрагментов. Присутствие в полосе составных фрагментов можно выявить, определив, гибридизуются ли они с пробамми левого и правого конца или с одной из них. Если полосы гибридизуются с обеими пробами, то это могут быть составные фрагменты, получившиеся при тандемном встраивании. Если они, с другой стороны, гибридизуются только с одной из проб, то это может оказаться зона, содержащая составные фрагменты, которые образовались при соединении обратных тандемных вставок, либо в этой зоне содержатся перестроенные фрагменты. При возникновении тандемных вставок (прямых или обратных) мол. массу составных фрагментов можно предсказать (рис. 6.3, Г).

3. Если полосы не соответствуют ни одному из приведенных выше критериев, скорее всего они состоят из перестроенных фрагментов и их анализ методом блоттинг-гибридизации по Саузерну может оказаться затруднительным. Для дальнейшего изучения такие полосы можно одновременно расщепить двумя рестриктазами, кроме того, использовать короткие специфические пробы и рестриктазы, узнающие последовательности из четырех нуклеотидов. Если результат и в этом случае трудно интерпретировать, то эти последовательности следует клонировать и определить в них порядок нуклеотидов.

Описанный выше метод предназначен для изучения тканей растений, трансформированных векторами на основе Ti-плазмид. В такой системе на концах перенесенной ДНК находятся повторы длиной 25 п. н. Весьма вероятно, что перед встраиванием Т-ДНК способна образовывать линейные конкатемеры и затем встраиваться в виде линейной молекулы. Таким образом, перед анализом можно сделать предварительную прикидку, какие фрагменты Т-ДНК можно ожидать в следующих случаях (рис. 6.3):

- Одна простая вставка на геном.
- Две или более отдельных вставок на геном.
- Две или более сцепленные копии в виде прямого или обратного тандемного повтора.
- Сочетание любых из трех приведенных выше событий.

Каждая из гибридизующихся полос, не удовлетворяющая ни одному из этих условий, может образовываться в результате вставок, содержащих делеции на любом из концов Т-ДНК, либо нести Т-ДНК, последовательности которой перемешаны при рекомбинации на одной из стадий до или после встраивания. Весьма важно, чтобы в подобном исследовании ткани состояли исключительно из трансформированных клеток одного типа. Подобный анализ лучше всего проводить на трансформирован-

ных колониях, полученных из одного клона, или, что предпочтительнее, на трансформированных растениях. Ткани, образующиеся при трансформации больших гетерогенных эксплантатов, могут содержать разнообразные типы трансформированных клеток, а также нетрансформированные клетки, что затрудняет интерпретацию результатов, полученных методом блоттинг-гибридизации по Саузерну. Следовательно, перед тем как исследовать Т-ДНК, рекомендуется уточнить, к какому клону принадлежит изучаемая ткань.

Когда клетки растения трансформированы векторами для прямого переноса генов посредством ДНК, сайты встраивания плазмиды, возможно, случайны. Таким образом, перенесенная ДНК может представлять собой целую плазмиду или ее части, которые соединены вместе в виде конкатемеров или встраиваются независимо друг от друга в разные сайты генома. В таком случае следует вначале убедиться в наличии интактных рестрикционных фрагментов, которые содержат изучаемый ген целиком. Дальнейшее исследование может вызвать затруднения. Есть данные, что в некоторых опытах использование линейаризованных векторов для переноса генов посредством ДНК приводит к повышению частоты трансформации. По-видимому, при этом легче образуются конкатемерные структуры, рекомбинация проходит по сайтам, не нарушающим экспрессию большинства копий изучаемого гена (рис. 6.3, Г). В этом случае предсказанные составные фрагменты могут быть выявлены методом блоттинг-гибридизации по Саузерну.

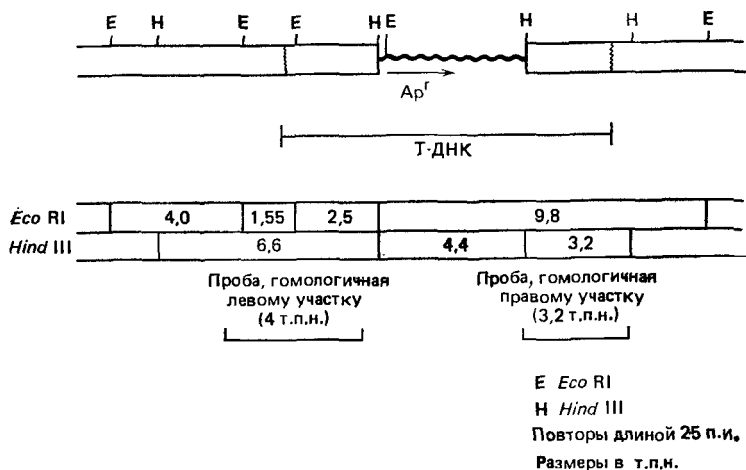
Любые данные по организации Т-ДНК проще интерпретировать после изучения наследования отдельных гибридизующихся фрагментов при разнообразных скрещиваниях. Если определенные полосы окажутся в одной группе сцепления, то весьма вероятно, что они представляют собой часть одной и той же вставки Т-ДНК. Следует отметить, что перенесенная ДНК не всегда экспрессируется; иногда это обусловлено метилированием [22]. Таким образом, при использовании для трансформации новых генов или новых видов растений в первую очередь следует изучить наследуемость определенных областей.

6.2.3. Изучение организации Т-ДНК в трансгенных растениях моркови методом блоттинг-гибридизации

Принцип метода будет рассмотрен на примере организации химерной Т-ДНК в трансформированных растениях моркови. Эта Т-ДНК состоит из гена устойчивости к канамицину (*pos-npt-II*), встроенного методами генетической инженерии между границами разоруженного вектора pGV3850 на основе агробактерий (разд. 1.1.7.1), сконструированного Замбрыски и со-

трудниками [57]. Рестрикционные карты плазмид рGV3850 и рGV3850::1103 приведены на рис. 6.4. Перенос этой ДНК в клетки моркови проводили путем совместного культивирования штамма агробактерий C5831(рGV3850::1103) с клетками проэмбрионной суспензионной культуры моркови [50], как опи-

А Область Т-ДНК рGV 3850



Б. Область Т-ДНК рGV 3850/рGV 1103

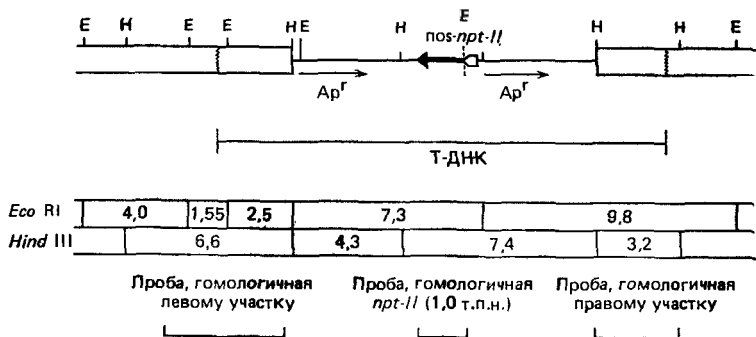


Рис. 6.4. Рестрикционные карты областей Т-ДНК плазмид рGV3850 и рGV3850::1103.

сано в разд. 2.10. О переносе и включении Т-ДНК судили, исследуя методом блоттинг-гибридизации по Саузерну ДНК, выделенную из ряда независимо полученных трансформированных колоний — Т2, Т3, Т5, Т9 и Т10. Для иллюстрации подобного подхода часть эксперимента, относящаяся к определению копий-

ности и изучению организации перенесенного гена *npt-II*, будет приведена в данном разделе. Кроме того, для полноты изложения мы обсудим анализ пограничных последовательностей, образовавшихся при встраивании этой Т-ДНК, однако конкретные данные не представлены.

Трансформирующая ДНК

Первое, с чего следует начать при постановке блоттинг-гибридизации по Саузерну,—это решить, с помощью какой рестриктазы (рестриктаз) можно получить требуемую информацию, используя имеющиеся в распоряжении пробы для гибридизации. Например, для точного определения копийности необходимо, чтобы вся ДНК встроенного гена умещалась в одном рестрикционном фрагменте и ее радиоактивный сигнал мог быть сравним с искусственной «исходной» ДНК. Изучение рестрикционной карты pGV3850::1103 (рис. 6.4) показывает, что в случае гена *npt-II* этого можно достигнуть с помощью двойного расщепления *HindIII* и *EcoRI*, либо используя каждый из ферментов по отдельности. Для всех трех случаев необходимо отметить следующее. Во-первых, при этом образуется фрагмент, включающий в себя все последовательности, гомологичные ДНК-пробе; причем проба гибридизуется только с одной полосой на фильтре, и, во-вторых, эти фрагменты не содержат пограничных последовательностей Т-ДНК, что вызвало бы появление большого числа гибридизующихся полос, если множественные вставки происходят более чем по одному сайту ДНК растения.

Для выявления пограничных фрагментов, содержащих участки соединения Т-ДНК и ДНК растения, ДНК следует обработать *HindIII*. Образующиеся при этом фрагменты обладают следующими важными свойствами: 1) включают в себя повтор размером 25 п.н. из Т-ДНК, а следовательно, содержат часть пограничного фрагмента, если он встроился в ДНК растения; 2) в достаточной степени перекрывают соответствующую пробу ДНК, что при гибридизации обеспечивает сильный сигнал. Принимая во внимание второй пункт, можно оценить гомологию между пробой, содержащей пограничный фрагмент, и пограничным фрагментом, образующимся в результате обработки *EcoRI*.

Исходная ДНК

Для правильной интерпретации данных, полученных в результате блоттинг-гибридизации по Саузерну, и для получения максимального количества информации на фильтр следует нанести различные образцы исходной ДНК. Такая исходная ДНК важна для определения копийности гена или изучаемой

последовательности. Чаще всего в качестве исходного используют переносимый ген в копииности $1\times$, $5\times$ и $10\times^a$). Для растений, трансформированных pGV3850::1103, удобно использовать препарат *Sall/HindIII* фрагмента плазмиды pNCAT4 (рис. 5.7), содержащего ген *nptII*, смешанный с соответствующим количеством контрольной ДНК, выделенной из нетрансформированной ткани. Для изучения организации встроенной Т-ДНК на фильтр следует нанести и остальную ДНК из агробактерий, содержащую плазмиды pGV3850 и pGV3850::1103. Такой препарат ДНК, естественно, должен быть обработан теми же рестриктазами, что и ДНК растения (*EcoRI* или *HindIII*). ДНК pGV3850 необходима для определения положения нестроенных рестрикционных фрагментов плазмиды, которые содержат левую и правую границы (*HindIII*:10 и *HindIII*:23 соответственно). ДНК pGV3850::1103 позволяет получить ту же информацию, а кроме того, выявить положение нестроенного гена *pos-npt-II* (рис. 6.4). Для дальнейшего анализа целесообразно нанести на фильтр в качестве маркера радиоактивно меченные фрагменты ДНК фага λ , обработанной *HindIII*.

6.2.3.1. Обеспечение

Оборудование и расходуемые материалы

Все необходимое для обработки ДНК рестриктазами (разд. 5.2), электрофореза в агарозном геле (разд. 5.3) и блоттинг-гибридизации по Саузерну (разд. 5.4 и 5.6).

Растворы и препараты

Растворы для рестрикции ДНК, как указано в разд. 5.2, и, кроме того:

- Препараты ДНК из трансформированных тканей растений (например, моркови, разд. 2.10).
- Плазмидная ДНК, содержащая изучаемые гены, для приготовления исходных растворов ДНК, предназначенных для определения копииности перенесенной ДНК (например, pNCAT4^a).
- Тотальная ДНК штамма агробактерий, использованного для трансформации. Этот препарат применяют в качестве исходного для определения мол. массы Т-ДНК в трансформированных тканях [например, штамм С58С1 (pGV3850::1103)].
- Рестриктазы (например, *EcoRI* и *HindIII*).
- Десятикратные буферы для рестриктаз (разд. 5.2).

Все необходимое для электрофореза в агарозном геле, как указано в разд. 5.3, и, кроме того:

- Одно- и десятикратные препараты исходной ДНК для определения копияности в случае генома растения, трансформированного геном *npt-II* (например, морковь^{a)}).

Все необходимое для блоттинга по Саузерну, как указано в разд. 5.4.

Все необходимое для гибридизации ДНК, как указано в разд. 5.5, и, кроме того:

- Проба, помеченная с помощью олигонуклеотидной затравки (например, ген *npt-II*, разд. 5.6).

6.2.3.2. Методика

Обработка ДНК рестриктазами

Детали использования рестриктаз приведены в разд. 5.2. В данном случае препараты ДНК готовили с помощью СТАВ-буфера (разд. 4.2.3) и содержание ДНК определяли в реакции с дифениламином (разд. 4.6). Таким образом, обработку рестриктазами известного количества ДНК можно проводить достаточно уверенно. Кроме того, в этом случае можно точно рассчитать копияность в исходных препаратах ДНК. В целом в связи с большой сложностью организации ДНК растений (по сравнению с ДНК фага λ или рBR322, используемых для проверки активности рестриктаз) и с тем, что в неочищенных препаратах могут содержаться примеси, снижающие активность рестриктаз, обычно используют 5—10 единиц фермента на 1 мкг ДНК растений, а обработку проводят по меньшей мере 2 ч.

1. Смешивают реагенты для рестрикции ДНК:

Рестриктаза *EcoRI* 2 мкл (25—50 ед.)

Десятикратный буфер для *EcoRI* 4 мкл

ДНК растения/ДНК агробактерий 5 мкг/100 нг (до 34 мкл)

Доводят до 40 мкл дистиллированной H_2O .

Ставят в пробирках Эппендорф следующие реакции:

Пробирка 1 Контроль: ДНК из нетрансформированной моркови.

Пробирки 2—6 Трансформанты моркови T2, T3, T5, T9, T10.

Пробирка 7 Тотальная ДНК *A. tumefaciens*.

Детали проведения рестрикции ДНК агробактерий см. также в разд. 1.12⁶⁾.

2. Тщательно перемешивают, собирают реакционную смесь на дне пробирки с помощью кратковременного центрифугирования и обрабатывают ДНК при 37°C (минимальное время обработки — 2 ч; максимальное — в течение ночи).

Таблица 6.1. Порядок нанесения образцов ДНК на гель для электрофореза

Дорожка	Образец	Объем, мкл
1	ДНК фага λ , обработанная <i>Hind</i> III, маркер	20
2	Тотальная ДНК рGV3850::1103	40
3	Исходный образец, 1× <i>npt</i> -II	20
4	ДНК моркови, контроль	40
5	T2	40
6	T3	40
7	T5	40
8	T9	40
9	T10	40
10	Исходный образец, 10× <i>npt</i> -II	20

3. Вынимают пробирки из водяной бани и центрифугируют, чтобы собрать конденсат с крышки.
4. Добавляют 4 мкл буфера для нанесения на гель. Тщательно перемешивают и центрифугируют в настольной центрифуге.

Фракционирование ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Подробно электрофорез препаратов ДНК, обработанных рестриктазой, описан в разд. 5.3. В данном примере препараты ДНК нанесены в порядке, указанном в табл. 6.1.

Перенос по Саузерну, приготовление проб и гибридизация ДНК

Подробно указанные методы описаны в разд. 5.4, 5.5 и 5.6. На рис. 6.5 приведены результаты гибридизации образцов, приготовленных, как на стадии 1 разд. 6.2.3.2. Необходимо отметить следующие важные особенности:

- Радиоактивно меченный ген *npt*-II гибридизуется с ДНК агробактерий и с ДНК каждого из трансформированных растений в виде одной полосы одинаковой подвижности во всех препаратах. С контрольной ДНК моркови данный ген не гибридизуется. Эти результаты свидетельствуют о том, что устойчивые к антибиотику растения содержат ген устойчивости к канамицину. Сравнивая подвижность фрагментов с маркерами (дорожка 1), можно определить, что эта полоса соответствует 7 т.п.н., и это точно совпадает с размером, предсказанным исходя из рестрикционной карты рGV3850::1103 (рис. 6.4).

- Трансформированные растения моркови, вероятно, содержат от 1 до 8 копий гена *npt-II* на геном, что можно определить, исходя из сравнения интенсивности зон гибридизации и исходных препаратов, содержащих 1X и 10X копий (дорожки 3 и 10 соответственно).

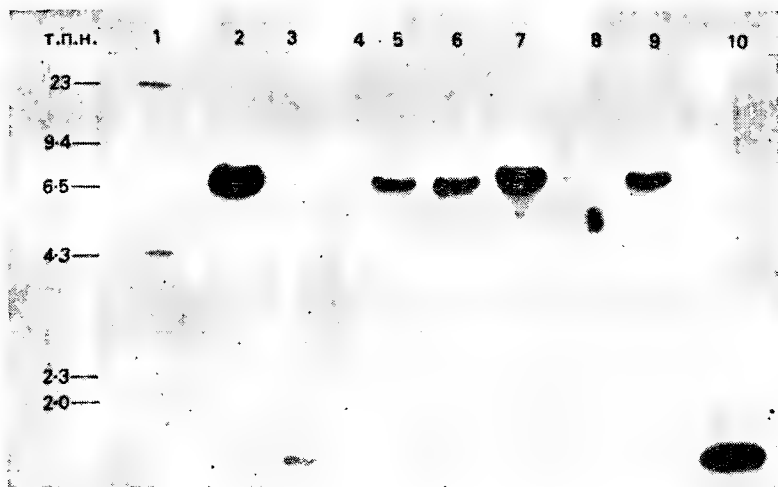


Рис. 6.5. Анализ последовательностей гена *npt-II* из каллуса моркови, устойчивого к канамицину, методом блоттинг-гибридизации по Саузерну. Каллус получен при совместном культивировании в суспензии клеток моркови и штамма *A. tumefaciens* C58C1 (pGV3850::1103). 5 мкг ДНК, обработанной *EcoRI*, фракционировали в агарозном геле, затем перенесли на нейлоновый фильтр Hybond-N и гибридизовали с меченым ^{32}P фрагментом *SalI-HindIII* гена *npt-II*, в котором содержалась кодирующая NPT-II область. Дорожка 1 — маркерная ДНК фага λ , обработанная *HindIII*; 2 — тотальная ДНК *A. tumefaciens* штамма C58C1 (pGV3850::1103), обработанная *EcoRI*. На дорожки 3 и 10 нанесены соответственно исходные образцы 1X и 10X для определения копийности гена *npt-II* (фрагмент *HindIII-SalI*). Дорожки 4—9 содержат соответственно контрольную ДНК моркови и ДНК из трансформированных каллусов T2, T3, T5, T9 и T10, устойчивых к канамицину.

Примечания

- а) Исходный препарат 1X состоит из препарата контрольной ДНК (из нетрансформированного растительного материала), к которой добавлен эквивалент одной копии гена на каждый гаплоидный геном растения. Перед тем как приготовить такой контроль, следует установить ряд параметров:
 - 1) Размер генома организма (в граммах).
 - 2) Концентрацию препарата ДНК, выделенного из этого организма.
 - 3) Размер рекомбинантной плазмиды, содержащей ДНК-пробу.
 - 4) Концентрацию этой плазмиды.

Пример: приготовление препаратов 1X и 10X исходной смеси для гена *npt-II* в трансформированном растении моркови.

Размер гаплоидного генома моркови

Количество ДНК, нанесенной на гель (см. табл. 6.1)

Число нанесенных гаплоидных геномов моркови

$$1,0 \text{ пг} = 10^{-12} \text{ г}$$

$$5,0 \text{ мкг} = 5 \times 10^{-6} \text{ г}$$

$$\frac{5 \times 10^{-6}}{10^{-12}} = 5 \times 10^6$$

Следовательно, для исходного разведения 1X требуется 5×10^6 копий фрагмента ДНК-пробы.

Исходную ДНК для растений, трансформированных pGV3850::1103, содержащую ген *npt-II*, готовят, используя плазмиду pNCAT4. Этот вектор содержит целиком ген *npt-II*, который может быть вырезан из плазмиды при совместной обработке *SalI/HindIII*. Отделять ген *npt-II* от ДНК вектора не требуется, поскольку в качестве пробы для гибридизации используют только этот рестрикционный фрагмент. Количество необходимой плазмидной ДНК можно рассчитать следующим образом:

Размер pNCAT4

$$\approx 8,0 \text{ т. п. н.}$$

Поскольку 1×10^6 т. п. н. ≈ 1 пг ДНК, это соответствует

$$8,0 \times 10^{-6} \text{ пг}$$

Количество для 5×10^6 копий

$$(5 \times 10^6) \times (8,0) \times (10^{-6}) \text{ пг} = 40,0 \text{ пг.}$$

Для удобства следует приготовить концентрированный раствор исходной ДНК: например, 2,0 мкг ($2,0 \times 10^6$ пг) плазмиды pNCAT4 обработать *SalI* и *HindIII* для отделения гена *npt-II* и затем развести до 1 мл. Теперь в 20 мкл пробы содержится:

$$2,0 \times 10^6 \times \frac{20}{1000} = 4 \times 10^4 \text{ пг pNCAT4}$$

Это и есть 1000X исходный раствор $\left[\frac{4 \times 10^4 \text{ пг}}{40,0 \text{ пг}} \right]$

Для приготовления образца 10X (400 пг) этот раствор разбавляют в 100 раз контрольной ДНК растения в концентрации 5,0 мкг/40 мкл (концентрация ДНК растения в изучаемых образцах).

Пробу 1X можно приготовить из концентрированного раствора либо, что гораздо удобнее, из пробы 10X, опять же разбавляя ее контрольной ДНК растения в соответствующей концентрации.

- 6) Следует принять некоторые меры для ограничения количества ДНК агробактерий, наносимого на гель, чтобы получившийся в итоге фильтр не оказался слишком «неуравновешенным» в отношении интенсивности конечного радиоактивного сигнала. Эта проблема возникает вследствие большого различия в размерах генома бактерии и растения. Поскольку известно, что Ti-плазмиды обнаруживаются в количестве 1—2 копии на бактериальную клетку, следует наносить такое количество агробактерий, которое было бы эквивалентно 1—5 геномам растения. К сожалению, это количество труднее подбирать для бинарных векторов в связи с тем, что их копийность в бактериальной клетке варьирует. В случаях когда копийность неизвестна, следует предварительно провести пробный блоттинг, чтобы определить, какое количество ДНК следует наносить.

6.3. Анализ экспрессии генов методом точечного нозерн-блоттинга

Точечный нозерн-блоттинг (dot blotting) очень удобен для количественного определения равновесной (постоянной) кон-

центрации специфических транскриптов, синтезирующихся на собственных или перенесенных генах. За последние несколько лет данный метод зарекомендовал себя особенно удобным для анализа регуляторных последовательностей, находящихся на 5'-конце гена. РНК выделяют из соответствующих тканей растений, выращенных в определенных условиях. Несколько разведений препаратов тотальной или poly(A)⁺-РНК наносят на нитроцеллюлозу в виде капель одинакового размера, а рядом наносят капли, содержащие определенные разведения контрольной РНК либо ДНК клонированного гена, чью экспрессию необходимо изучить. Затем фильтр гибридизуют так же, как и в случае блоттинг-гибридизации по Саузерну (гл. 5), радиоавтографируют и определяют содержание определенных транскриптов в каждой капле ДНК относительно друг друга, а также сравнивают с контрольными образцами нуклеиновых кислот.

Метод используют в различных случаях.

- Если перенесенный ген совершенно новый для определенного генома и не обладает гомологией с нативной ДНК растения (например, ген *npt-II* для любого растения [24]).
- Если условия гибридизации подобраны таким образом, что гетерологичные пробы могут помочь различить транскрипты с нативных и чужеродных генов в трансгенных растениях (например, ген малой субъединицы РБФК/О [*rbcS-E9*] гороха в петунии [9]).
- Если можно получить пробы для гибридизации (синтетические олигонуклеотиды или кДНК, или геномные субклоны), комплементарные негомологичным областям нуклеотидной последовательности в нетранслируемой области транскрипта и помогающие различить нативный и перенесенный ген в трансгенных растениях или же различить транскрипты, образовавшиеся в результате экспрессии различных членов мультигенного семейства (например, экспрессия семейства генов *Cab* в петунии [12]).
- Если синтетический олигонуклеотид можно использовать для «навешивания ярлыка», т. е. для введения характерного участка в ген дикого типа. Так был получен, например, новый транскрипт пататина в картофеле.

В следующем разделе описано использование нозерн-блоттинга для изучения равновесной концентрации транскриптов семейства генов *Cab* в горохе после различной световой обработки. Нозерн-блоттинг можно использовать для количественного определения РНК, если есть основания полагать, что существует ряд гомологичных транскриптов, или же при необходимости определить размеры транскрипта. Общая методика представлена в приложении 6 [1]. Следует отметить, что но-

зерн-блоттинг не обладает такой чувствительностью, как точечный блоттинг.

6.3.1. Регуляция транскрипции гена *Cab* в этиолированном растении гороха под действием фитохрома

6.3.1.1. Общие положения

Во многих работах анализируют последовательности 5'-ДНК, расположенные перед кодирующими участками генов, про экспрессию которых известно, что она регулируется светом

Геномный клон РБФК/О гороха (МС РБФК/О S-E9)

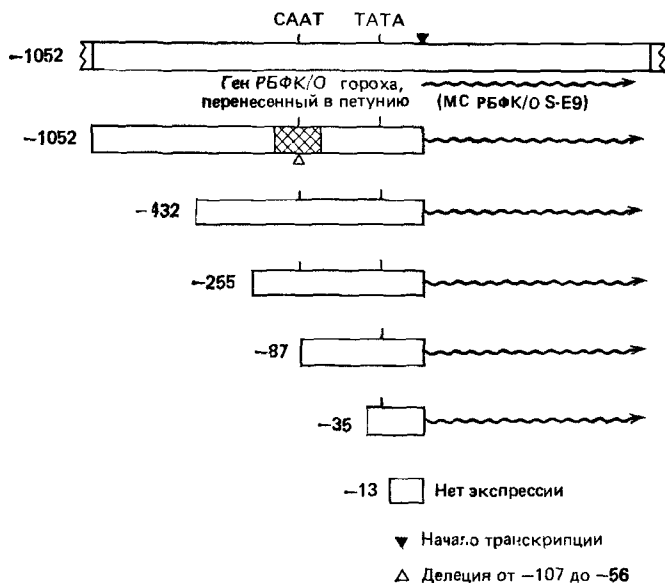


Рис. 6.6. Анализ регулируемой светом области гена МС РБФК/О гороха методом делеционного мутагенеза и определения количества транскриптов в трансгенном растении петуньи.

и органоспецифична. Примером могут служить гены, кодирующие малую субъединицу (МС) РБФК/О и белок, связывающий хлорофилл *a/b* (*Cab*).

Экспериментальные данные о 5'-последовательностях

Геномный клон *rbcS*-E9, содержащий ген МС РБФК/О гороха, содержит всю 5'-последовательность вплоть до —1052 (рис. 6.6). Если такой геномный клон перенести в петунью, его

транскрипция в каллусе происходит правильно и регулируется светом. С помощью точечного нозерн-блоттинга изучали транскрипцию в делеционных мутантах гена *rbcS-E9* (рис. 6.6) в трансгенных тканях петунии [9]. Потеря последовательностей от —1052 до —437 приводила к трехкратному снижению уровня транскрипции на свету, однако не влияла на уровень транскрипции в темноте. Делеция до —35 приводила к дальнейшему снижению уровня транскрипции на свету, а делеция до —33 прекращала транскрипцию при любых условиях. Делеция нуклеотидов от —352 до —35, включая блок СААТ, слабо влияла на транскрипцию.

На основании этих данных можно сделать вывод, что 5'-последовательность размером 33 п.н., включающая в себя блок ТАТА, — это все, что требуется для обеспечения чувствительности к свету. Интересно отметить, что область между блоком ТАТА и сайтом САР сохраняется в ряде клонов, несущих ген малой субъединицы и имеющих усредненную последовательность GATTATATATAG^c/A. Тканеспецифическая экспрессия определяется лишь последовательностью до —352.

Фитохром как модулятор экспрессии генов

Фитохром участвует в самых разнообразных реакциях растений на воздействие света, регуляции экспрессии генов, морфогенеза и других физиологических процессов. Фитохром активен в весьма широком диапазоне интенсивности света. Фитохром существует в двух формах, *Pr* и *Pfr*, которые могут переходить одна в другую с максимумами поглощения при 660 и 730 нм соответственно. При освещении светом с широким спектром возникающее равновесие фитохромов (соотношение уровней *Pr* и *Pfr*) зависит от соотношения красного и дальнего красного света и практически не зависит от уровня потока фотонов. В описанном ниже эксперименте используют растения, выросшие в темноте (этиолированные), которые содержат лишь одну форму фитохрома, *Pfr*, в которой он синтезируется. Короткое облучение красным светом обеспечивает превращение практически всего *Pfr* в *Pr*, хотя небольшое количество *Pfr* сохраняется, поскольку эта форма слабо поглощает при 660 нм. К изменениям экспрессии генов, которые, как показано, происходят после облучения красным светом, относятся: повышение синтеза МС и Саb, уменьшение содержания НАДФН-протохлорофиллид-оксидоредуктазы (ПХР) и снижение количества фитохрома (последний саморегулируется по крайней мере в этиолированном овсе). Такие изменения в большой степени могут быть обратимы при освещении после красного света дальним красным. Уровни темновой транскрипции никогда не восстанавливаются вследствие неполного превращения *Pfr* в

Рг, поскольку Рг обладает некоторым поглощением при длинах волн около 730 нм. Именно поэтому освещение растений, выращенных в темноте, дальним красным светом приводит к тому же результату, что и освещение красным светом, хотя и в меньшей степени.

В приведенном ниже эксперименте изучали регулируемую фитохромом транскрипцию собственных генов *Cab* у этиолированного растения гороха. РНК из гороха, выращенного в разных режимах освещения, выделяли, как описано в разд. 4.7. Цель эксперимента — определение в каждом образце уровня транскрипции мРНК с генов *Cab* методом количественного точечного нозери-блоттинга. В качестве пробы для гибридизации использовали клоны кДНК гена *Cab*.

6.3.1.2. Обеспечение

Оборудование и расходимые материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Нитроцеллюлозный фильтр (8×3 см), предварительно смоченный раствором 20×SSC и высушенный на воздухе.
- Водяная баня на 65°C со штативом для пробирок Эппендорф.
- Показываемая водяная баня на 42°C.
- Кипящая водяная баня.
- Небольшая коробка с плотной крышкой из полипропилена.

Растворы

- Двадцатикратный SSPE, см. разд. 5.5.2.
 - 10%-ный ДСН.
 - Стократный раствор Денхардта (2%-ный БСА: 2%-ный фико-колл 400, 2%-ный поливинилпирролидон). На 100 мл:

БСА	2 г
Фикоколл 400 (Sigma)	2 г
Поливинилпирролидон	2 г.
- Слегка нагревая, растворяют в дистиллированной воде. Разливают соответствующие аликвоты (например, по 10 мл в пробирки со шлифом) и хранят при —20°C.
- Формамид (BDH Analar): деионизуют, добавив 5 г катионо-анионообменника на 100 мл (например, можно использовать Амберлит MG-1 фирмы BDH).
 - ДНК спермы лосося (Sigma): растворяют в концентрации 10 мг/мл в дистиллированной H₂O, трижды озвучивают по 20 с, прогревают 10 мин на кипящей водяной бане и хранят при —20°C.

- $20 \times \text{SSC}$, см. разд. 5.4.2.
- Раствор А для отмывания: $2 \times \text{SSC} + 0,1\% \text{ ДСН}$.
- Раствор Б для отмывания: $0,2 \times \text{SSC}$.
- Буфер для точечной гибридизации РНК на фильтре [50%-ный формамид, $6 \times \text{SSPE}^{\text{a)}$], пятикратный раствор Денхардта, 0,4%-ный ДСН, 0,2 мг/мл ДНК спермы лосося, 6%-ный полиэтиленгликоль (6000 или 8000)]. На 100 мл:

Деионизованный формамид	50 мл
$20 \times \text{SSPE}^{\text{a)}$	30 мл
$10 \times$ раствор Денхардта	5 мл
10%-ный ДСН	4 мл
10 мг/мл ДНК спермы лосося	2 мл
ПЭГ (6000 или 8000)	6 г.

Каждый раз готовят свежий раствор.

- Проба ДНК гена *Cab*, меченная ^{32}P (разд. 5.6).
- Препараты РНК с концентрацией 0,5 мг/мл, выделенные из проростков гороха, как описано в разд. 4.7.3. Используют этиолированные проростки после различных световых обработок согласно схеме, приведенной в табл. 6.2.

Таблица 6.2. Нанесение и обработка пятен при точечном блоттинге

Образец	А, мкг	В, мкг	Обработка
1	0,1	1,0	Темнота, контроль
2	«	«	Темнота+6 мин освещения красным светом
3	«	«	Темнота+15 мин освещения дальним красным светом
4	«	«	Темнота+6 мин освещения красным светом+15 мин освещения дальним красным светом
5	«	«	Темнота+освещение белым светом

6.3.1.3. Методика

В клетках растений, выращенных на свету, в наибольшей концентрации выявляется мРНК гена *Cab*. В данном эксперименте на фильтр в виде точек наносят тотальную РНК лишь в двух концентрациях (0,1 и 1 мкг). Сравнивают относительное содержание транскриптов гена *Cab* в недеградированных препаратах тотальной РНК, выделенной из облученных проростков. Чувствительность метода в случае молекул, выявляемых в меньшей концентрации, может быть значительно повышена благодаря использованию poly(A)^+ -мРНК. В меньшей степени чувствительность повышается при увеличении количества наносимой тотальной РНК, вплоть до 5 мкг на точку.

1. Готовят в двух пробирках Эппендорф по два разведения каждого препарата РНК так, чтобы их концентрация составляла 0,2 мг/мл и 0,02 мг/мл в $6 \times \text{SSC}$:

	РНК	$20 \times \text{SSC}$	H_2O
0,20 мг/мл	4,0 мкл	3,0 мкл	3,0 мкл
0,02 мг/мл	1,0 мкл	7,5 мкл	16,5 мкл.

2. Нагревают препараты в течение 15 мин при 65°C на водяной бане для денатурации РНК, затем охлаждают на льду. Наносят по 5,0 мкл каждого разведения препарата в центр расчерченной области (слегка размечают шариковой ручкой прямоугольники $1,5 \times 3$ см) фильтра, как указано в табл. 6.2. Фильтр следует поместить на непитьвающую поверхность (например, «Парафильм»). Образец необходимо наносить очень медленно, чтобы получились маленькие аккуратные точки диаметром 0,5—0,7 мм.
3. Когда точки высохнут, помещают нитроцеллюлозный фильтр внутрь сложенного листа фильтровальной бумаги и нагревают в вакуумной печи при 80°C в течение 1 ч⁶⁾.
4. Помещают нитроцеллюлозный фильтр в коробку для гибридизации и заливают 25 мл гибридизационного буфера, стараясь избежать попадания пузырьков воздуха. Инкубируют на покачиваемой водяной бане при 42°C в течение 1 ч.
5. Сливают буфер для гибридизации, однако нитроцеллюлозный фильтр(ы) должен быть едва покрыт раствором. Нагревают меченую пробу на кипящей водяной бане в течение 10 мин (обычно берут 10 нг пробы⁶⁾) и добавляют ее в буфер для гибридизации, чтобы конечная концентрация составляла примерно 1—2 нг/мл. Инкубируют на покачиваемой водяной бане при 42°C в течение ночи либо по меньшей мере 12 ч.
6. Сливают гибридизационную смесь и дважды промывают фильтры по 20 мин в растворе А для отмывания (раствор предварительно прогревают до 42°C).
7. Промывают фильтр в течение 15 мин в предварительно подогретом растворе Б для отмывания.
8. Высушивают фильтр на воздухе, прикладывают к куску бумаги Whatman 3 ММ, обертывают пленкой (Saran Wrap) и в зависимости от силы сигнала экспонируют с пленкой Hyperfilm от нескольких часов до нескольких дней.
9. Типичный для описываемого эксперимента радиоавтограф представлен на рис. 6.7. Хорошо видно, что количество транскриптов гена *Cab* в темноте (1) гораздо ниже, чем при освещении белым светом (5). В пользу участия фитохрома в этом процессе свидетельствует следующее: содержание транскриптов генов *Cab* в препаратах тотальной РНК возрастает после освещения красным светом (2), а не дальним

красным светом (3); кроме того, данные указывают на то, что повышенный по сравнению с темнотой уровень транскрипции при красном свете может быть частично снижен облучением дальним красным светом (4).

Примечания

- a) SSPE в присутствии формамида обладает несколько большей буферной емкостью, чем SSC.
- b) Пробы данного объема и концентрации достаточно для шести нитроцеллюлозных фильтров указанного размера.

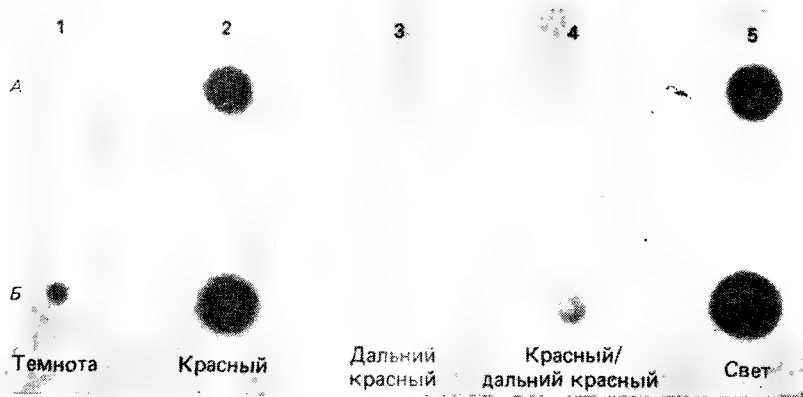


Рис. 6.7. Контроль транскрипции гена *Gab* под действием фитохрома в этилированных проростках гороха. Точечный нозерн-блоттинг тотальной мРНК, выделенной из растущих на свету растений и этилированных проростков гороха через 16 ч после различных световых обработок. А — 0,1 мкг мРНК; Б — 1,0 мкг мРНК. Обработка: 1 — темновой контроль; 2 — выращивание в темноте с 6-мин облучением красным светом; 3 — выращивание в темноте с 15-мин облучением дальним красным светом; 4 — выращивание в темноте с 6-мин облучением красным светом, за которым сразу же следует облучение дальним красным светом в течение 15 мин; 5 — проростки, выращенные на свету.

6.4. Использование САТ в качестве индикаторного гена для изучения контроля экспрессии генов в различных органах и при изменении условий среды

6.4.1. Общие положения

Как фитохром участвует в световой регуляции генов типа *Cab*? В последнее время несколько групп исследователей попытались ответить на этот вопрос, сперва идентифицируя, а затем селективно изменяя *цис*-действующие регуляторные элементы генов, активность которых регулируется светом. В этом отно-

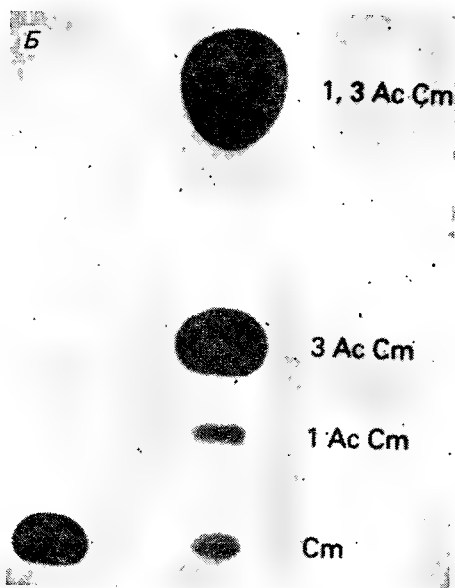
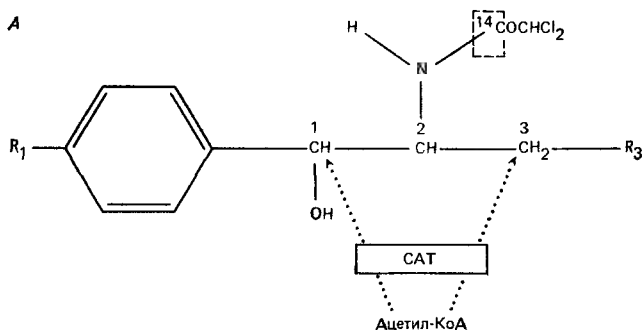


Рис. 6.8. Радиометрическое определение хлорамфениколацетилтрансферазы.
A. Структура хлорамфеникола с указанием сайтов ацетилирования при участии CAT.

Б. Радиоавтограф пластинки ТСХ для определения САТ с указанием положения трех форм ацетилированного (1-ацетил-, 3-ацетил- и 1,3-диацетилхлорамфеникола) и неацетилированного хлорамфеникола.

шении наиболее хорошо изучены гены малой субъединицы (МС) рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (РБФК) и хлорофилл а/б-связывающего белка (Cab). Синтез указанных белков зависит от светового облучения. Как мы уже отмечали во введении к данной главе, для успешного изучения регуляторных последовательностей этих генов их соединяют с индикаторными генами, кодирующими фермент (например, *npt-II* и *cat/c*) с последующим анализом экспрессии химерного гена в трансгенных растениях. Ген *cat* из транспозона Tn9 придает бактерии устойчивость к хлорамфениколу. Его используют в качестве индикаторного при трансформации клеток как животных [16, 17], так и растений [10, 14, 23, 24, 25, 39]. «Популярность» данного гена обусловлена рядом причин: его легко выделять в больших количествах из бактерий, содержащих мультикопийную плазмиду, в состав которой входит Tn9, либо из рекомбинантной плазмиды типа pBR325 [5], содержащей только ген *cat*. Кодирующая последовательность этого гена невелика (700 п.н.), и, следовательно, с ним легко работать. Кроме того, для выявления продукта гена *cat* (хлорамфениколацетилтрансферазы, САТ) разработан довольно простой радиометрический анализ в жидкой фазе.

6.4.2. Определение активности хлорамфениколацетилтрансферазы (САТ)

6.4.2.1. Общие положения

САТ инактивирует хлорамфеникол посредством ацетилирования двух сайтов молекулы антибиотика (рис. 6.8, А). Таким образом, в результате реакции образуются три формы ацетилированного хлорамфеникола: две промежуточные формы моноацетатов (1-ацетилхлорамфеникол и 3-ацетилхлорамфеникол), а при протекании реакции до конца — диацетатная форма (1,3-диацетилхлорамфеникол). Излагаемое в данном разделе определение активности САТ основано на том, что неацетилированный хлорамфеникол и три формы ацетилированного хлорамфеникола обладают различной растворимостью в хлороформе и, следовательно, разделяются методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), если в качестве элюента используют хлороформ. Добавление 5% метанола делает эффект более явным, и поэтому метанол тоже включают в состав элюента. В качестве субстрата используют радиоактивно меченный ^{14}C хлорамфеникол и, кроме того, в реакцию добавляют кофактор ацетил-КоА. Описанный ниже метод определения активности САТ применим в случае самых разнообразных экстрактов тканей, полученных, как указано в разд. 3.3.2 и 6.4.3.

6.4.2.2. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Пластмассовые мешалки (Sarstedt).
- Ультразвуковая установка с микронасадкой.
- Смеситель «Вортекс».
- Водяные бани на 37 и 65 °С.
- Пластины для ТСХ (например, Merck Kieselgel, кат. № 5729) и резервуар для них.
- Кассета для экспонирования с рентгеновской пленкой.

Растворы

- Контрольный раствор, обладающий САТ-активностью: например, тотальный экстракт штамма *E. coli*, несущего рBR325 (см. приложение 6 [II]), либо очищенная САТ, имеющаяся в продаже^a).
- Лейпептин, 10 мг/мл (Sigma): растворяют в дистиллированной H₂O, хранят при —20 °С.
- Буфер для экстракции (0,25 М трис-НСl, рН 7,8; 0,5 мМ лейпептин).

На 10 мл:

2,0 М трис-НСl, рН 7,8 1,25 мл

10 мг/мл лейпептин 0,24 мл

Доводят до 10 мл дистиллированной H₂O. Хранят при —20 °С в течение месяца.

- Раствор ¹⁴С-хлорамфеникола: D-трео-(дихлорацетил-1-¹⁴С) хлорамфеникол (Amersham С А.515; 50—60 Ки/ммоль; 1,85—2,2 ГБк/ммоль). Как правило, раствор не разводят.
- Раствор ацетил-КоА: растворяют 10,0 мг ацетил-КоА (Sigma, кат. № А-2897) в 50 мкл дистиллированной H₂O. Готовят непосредственно перед использованием.
- Растворитель хлороформ/метанол (95 : 5).

6.4.2.3. Методика

1. *Протопласты*: собирают клетки, полученные из протопластов, обработанных вектором (разд. 3.2 и 3.3), путем центрифугирования в пробирках Эппендорф на малых скоростях. Удаляют супернатант, добавляют равный объем буфера для экстракции САТ (≈ 100 мкл) и дважды озвучивают на льду по 30 с, охлаждая в промежутке в течение 30 с. *Зрелые растения или ткань проростков*: собирают 100 мг (удаляют среднюю жилку и крупные сосуды) и разбивают пластмассовой мешалкой в 100 мкл буфера для экстракции САТ⁶).

2. Инкубируют экстракты при 65 °С в течение 1 мин^{в)}.
3. Смешивают экстракты с 1,0 мкл ¹⁴С-хлорамфеникола (0,0074 МБк, 0,2 мкКи/образец, конечная концентрация) и 3,0 мкл раствора ацетил-КоА^{г)}. Ставят аналогичную реакцию, взяв 50^{а)} мкл контрольного бактериального экстракта, обладающего САТ-активностью.
4. Инкубируют при 37 °С 60 мин^{д)}.
5. Добавляют 300 мкл этилацетата^{е)} и тщательно перемешивают на «Вортексе».
6. Центрифугируют в течение 2 мин на большой скорости в мини-центрифуге и затем переносят этилацетат (верхний слой) в чистую пробирку Эппендорф. Стараются не захватить водную фазу^{ж)}.
7. Полностью выпаривают этилацетат под вакуумом в эксикаторе^{з)}.
8. Добавляют 20 мкл этилацетата и перерастворяют хлорамфеникол, встряхивая на «Вортексе» в течение 30 с.
9. Наносят образцы вдоль края пластинки для ТСХ, отступая 1 см от края и с промежутками около 1,25 см между образцами.
10. Выстилают внутреннюю поверхность резервуара для ТСХ фильтровальной бумагой (Whatman 3 MM), чтобы поддерживать равновесие фаз, и заливают его смесью хлороформ/метанол^{и)} в соотношении 95 : 5^{к)} на глубину 0,5 см. Для проведения хроматографии погружают пластинку в резервуар, прислонив ее к стенке, причем конец пластинки, на который нанесены образцы, должен находиться в элюенте. Закрывают резервуар крышкой и ждут, пока фронт растворителя не достигнет верха пластинки (20—30 мин).
11. Вынимают пластинку из резервуара, высушивают на воздухе и подвергают радиоавтографии в течение 12—24 ч. При участии бактериальной САТ, как правило, образуются все три формы ацетилированного хлорамфеникола (См) и небольшое количество неацетилированного (рис. 6.8, Б). Если реакция прошла до конца, то в основном образуется ди-ацетат, а неацетилированный хлорамфеникол может не обнаруживаться.

Примечания

- ^{а)} 1—10 единиц очищенной САТ, предлагаемой рядом поставщиков, включая Pharmacia, P-L Biochemicals, Sigma.
- ^{б)} Имеются сообщения и об использовании более сложных буферов, но, согласно нашему опыту, это в конечном счете снижает эффективность реакции.
- ^{в)} Обработка инактивирует компоненты грубого растительного экстракта, ингибирующие активность САТ.

- г) Раствор ацетил-КоА весьма нестабилен, и его либо следует готовить заново, либо хранить при -20°C не более 10 дней.
- д) Если добавить достаточное количество активного ацетил-КоА, время инкубации может быть увеличено до 60 мин.
- е) Этилацетат — сильный растворитель, и его можно набирать лишь стеклянными пипетками либо наконечниками типа Gilson.
- ж) Попавшая в конечный экстракт вода испортит хроматограмму.
- з) На этой стадии следует избегать слишком быстрого установления вакуума, поскольку это может привести к взрывоподобному испарению и потере образца. При умеренном вакууме данная стадия может занимать до 5 ч.
- и) Метанол улучшает относительное разделение трех ацетилированных форм хлорамфеникола.
- к) Каждый раз готовят свежий раствор, поскольку хлороформ весьма летуч.

6.4.3. Примеры использования *cat* в качестве индикаторного гена для изучения контроля экспрессии гена *Cab-cat* в различных органах и в зависимости от условий среды

Надь с соавторами [39] соединил фрагмент, расположенный на 5'-конце гена *Cab* пшеницы (*Cab*), с кодирующей областью гена *cat*. Эта конструкция была перенесена в клетки табака, и оказалось, что сама по себе последовательность, расположенная с 5'-конца гена *Cab*, может придавать гену *cat* как способность к регуляции фитохромом, так и тканеспецифичность. На рис. 6.9, А представлена конструкция *Cab-cat*, весьма сход-

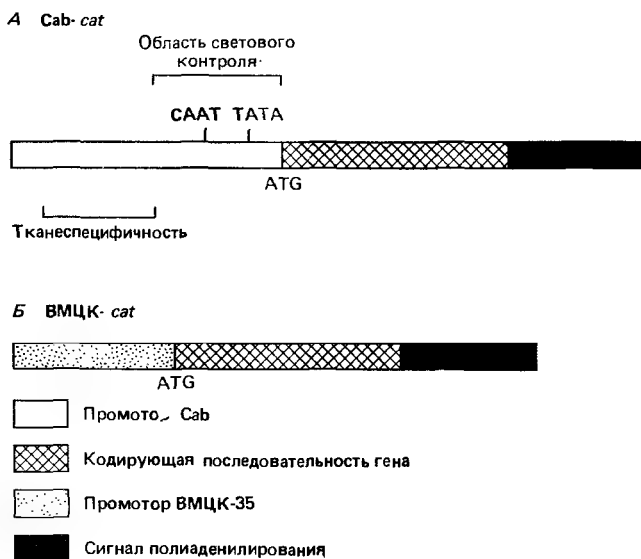


Рис. 6.9. Строение участков слитых генов *Cab-cat* и *CaMV-cat*, подлежащих транскрипции. (ВМЦК тождественно CaMV.)

ная с той, которую использовали Надь и соавторы [39]. Такую конструкцию переносили в клетки табака и применяли в экспериментах по изучению регуляции экспрессии этих последовательностей. Активность промотора гена *Cab* (*Cab*) сравнивали с конститутивно экспрессирующимся промотором 35S (рис. 6.9, Б) вируса мозаики цветной капусты (рис. 6.9, Б).

6.4.3.1. Сравнение экспрессии химерного гена *Cab-cat* в трансгенных растениях на свету и в темноте

Световую регуляцию экспрессии гена *Cab-cat* в трансгенных растениях можно выявить, сравнивая активности САТ в ткани листьев растений, выросших на свету и в темноте. Проще всего провести подобный эксперимент на двух растениях, из которых одно за 4—5 дней до опыта выращивают в темноте, а другое содержат при нормальном режиме свет/темнота. Однако такая постановка опыта все же не может считаться удовлетворительной, поскольку результаты могут объясняться разницей между отдельными растениями (например, влияние эффекта «положения» вставки Т-ДНК), а не световой обработкой. Самый простой способ решения этой задачи — размножить одно трансгенное растение и получить в потомстве как минимум два клонированных растения. Поскольку такие растения идентичны, это устранит возможное влияние генетических различий на результаты эксперимента. Для проведения эксперимента одно из клонированных растений в течение 7—10 дней выращивают в темноте, и за это время все новые побеги оказываются этиолированными. Сравнение активности САТ в клонах, выросших на свету (5) и в темноте (6), свидетельствует о том, что экспрессия гена *Cab-cat* стимулируется светом (рис. 6.10). Контрольные пятна (3 и 4) показывают, что экспрессия промотора 35S *CaMV* в меньшей степени зависит от света. Снижение активности САТ в растениях, содержащих *cat-CaMV* и выросших в темноте, вероятно, является косвенным последствием отсутствия света, а не результатом специфической регуляции светом. Проводя эксперименты такого типа, важно оптимизировать продолжительность темновой обработки, чтобы максимально усилить специфические эффекты экспрессии гена и свести к минимуму общее действие, вызванное голоданием. Кроме подтверждения световой регуляции результаты эксперимента свидетельствуют и о том, что промотор 35S *CaMV* обеспечивает гораздо более эффективную экспрессию гена *cat*, чем промотор гена *Cab* (сравните сигнал на дорожках 3 и 5). Отсутствие пятен на дорожке 2 указывает на то, что растения табака дикого типа SR1 проявляют очень низкую активность ацетилирования хлорамфеникола.

6.4.3.2. Регуляция экспрессии гена *Cab-cat* фитохромом

Для изучения роли фитохрома в световой регуляции гена *Cab-cat* необходимы более тонкие эксперименты, которые способны показать, что экспрессия этого гена может меняться в зависимости от кратковременного облучения красным и дальним красным светом. Подобные опыты лучше всего проводить с 7—14-дневными этиолированными проростками, полученными из стерильных семян, замоченных в культуральной среде с последующей инкубацией в полной темноте (подробнее о проращивании

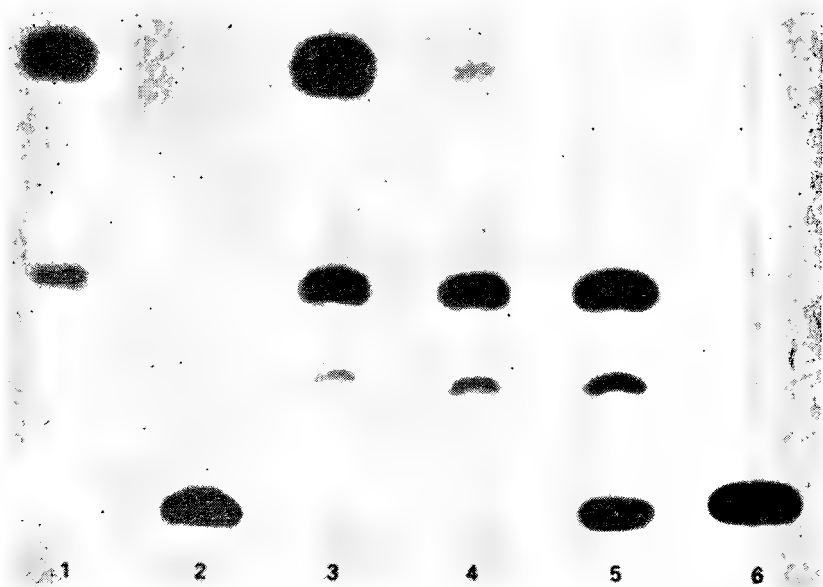


Рис. 6.10. Использование системы маркерного гена *Cat* для выявления световой регуляции экспрессии гена *Cab* в трансгенных растениях табака. 1 — положительный контроль, содержащий бактериальную CAT; 2 — контрольные растения табака, выращенные на свету (SR1); 3 — выращенные на свету растения *CaMV-cat*; 4 — выдержанные в темноте растения *CaMV-cat*; 5 — выращенные на свету растения *Cab-cat*; 6 — выращенные в темноте растения *Cab-cat*.

вании семян см. разд. 2.5.2.2). Такая постановка эксперимента приводит к тому, что до световой обработки активность САТ не обнаруживается и, кроме того, облегчает работу с материалом. Короткое освещение проростков, несущих ген *Cab-cat*, красным светом стимулирует синтез САТ в ткани листа, который постепенно достигает максимума через 16 ч после обработки (рис. 6.11, дорожки L и R). Полученный эффект может быть обратим, если вслед за красным светом растения сразу же облу-

чить дальним красным светом (FR). Такой тип экспрессии характерен для генов, регуляция которых зависит от фитохрома. Сила ответа может быть проиллюстрирована тем фактом, что уровень экспрессии САТ в проростках, освещенных красным светом (R), достигает уровня экспрессии в проростках, выращенных на свету, а обращение эффекта, вызванное облучением дальним красным светом, приводит к тому, что уровень экспрессии САТ не превышает уровня синтеза этого фермента в темноте (D).

6.4.3.3. Органоспецифическая экспрессия химерного гена *Cab-cat*

Новосинтезированный *Cab* транспортируется в хлоропласт, где входит в состав светособирающего комплекса тилакоидных [1] мембран. Однако такие белки синтезируются не во всех

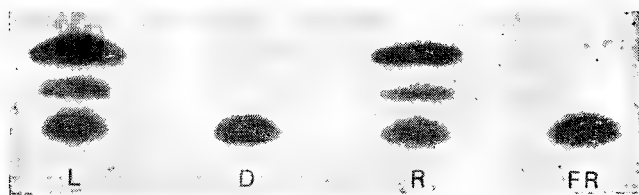


Рис. 6.11. Контроль экспрессии гена *Cab* под действием фитохрома. 14-дневные проростки табака *Cab-cat*, как выращенные на свету, так и этиолированные, облучаемые светом с различной длиной волн и затем помещенные в темноту. Определение САТ проводилось через 16 ч после облучения. L — постоянный белый свет; D — постоянная темнота; R — темнота и 6-мин облучение красным светом; FR — темнота и 6-мин облучение красным светом, за которым сразу же следует 15-мин освещение дальним красным светом.

клетках растения. Сходным образом зрелые функционирующие хлоропласты неравномерно распределены по всем клеткам растения. Больше всего их в фотосинтезирующих тканях листа, меньше — в ткани стебля, и обычно хлоропласты почти полностью отсутствуют в ткани корня. Оказалось, что транскрипция с промотора гена *Cab* зависит от прилегающих к нему последовательностей энхансера и сайленсера (подробнее см. разд.6.1), которые отвечают за то, что любой ген, находящийся под их контролем (ген *Cab* в естественном окружении), экспрессируется только в тех органах, где обнаружены хлоропласты. Результаты, представленные на рис. 6.12, ясно подтверждают, что это происходит, когда ген *cat* находится под контролем промотора гена *Cab*, причем максимальные уровни САТ обнаруживаются в листьях (L), меньшее количество — в стебле (S) и в

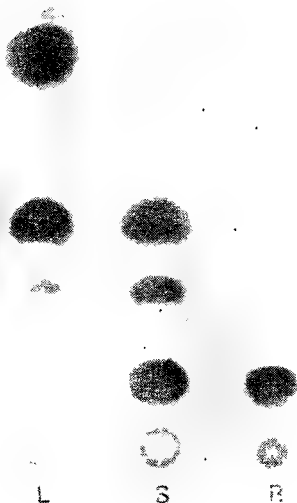


Рис. 6.12. Тканеспецифическая экспрессия гена *Cab* в трансгенных растениях табака. САТ определяли в листьях (L), стебле (S) и корнях (R) зрелых *Cab-cat*-растений, выращенных на свету.

наименьшей степени (либо вообще не обнаруживаются) — в корнях (R).

Тканеспецифическую экспрессию гена *Cab-cat* можно выявить и в целом растении. Контрольные семена с конструкциями *Cab-cat* и *CaMV-cat* проращивают в присутствии 25 мкг/мл хлорамфеникола. Как показано на рис. 6.13, проростки *CaMV-cat* полностью устойчивы к антибиотику, а проростки *Cab-cat* лишь ненамного более устойчивы, чем контрольные проростки SR1. Такое разное воздействие хлорамфеникола на эти проростки выражено весьма отчетливо вопреки тому, что все ткани листа как *Cab-cat*-, так и *CaMV-cat*-растений содержат легко выявляемые уровни активности САТ (рис. 6.10). Результаты предыдущего эксперимента позволяют предположить, что именно отсут-

ствие активности САТ в корнях *Cab-cat*-растений определяет их чувствительность к хлорамфениколу. Таким образом, результаты данного эксперимента убедительно показывают, что промоторная последовательность гена *Cab* на уровне всего фенотипа тканеспецифична. В этом случае в корнях функционирует специфический «сайленсер».

6.5. Применение неомицинофосфотрансферазы-II (NPT-II) в качестве индикаторного белка для изучения роли последовательностей, участвующих в переносе белков (транзитных пептидов)

6.5.1. Общие положения

Неомицинофосфотрансфераза-II (NPT-II) представляет собой бактериальный фермент небольшой мол. массы (25 кДа), который катализирует *о*-фосфорилирование ряда аминокликозидных антибиотиков, например неомицина, канамицина и антибиотика G418. Реакция осуществляется посредством переноса γ -фосфатной группы АТР на молекулу антибиотика, что приводит к нарушению его функциональной активности, поскольку он боль-

ше не способен взаимодействовать со своей мишенью, с рибосомой. Эта реакция переноса была использована для разработки чувствительного метода анализа фермента в твердой фазе (разд. 6.7). Доступность такого типа определения и тот факт, что фермент относительно нечувствителен к присутствию N-концевых пептидов, позволяют использовать NPT-II для изучения пептидов, участвующих в переносе белков (транзитных пептидов).

В тканях высших растений хлоропласты представляют собой полуавтономные образования, каждое из которых имеет собственный геном и систему белкового синтеза. Однако большая

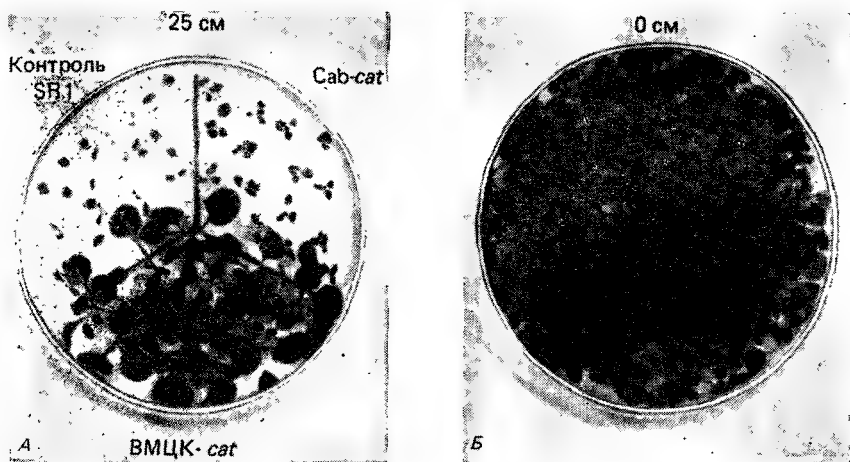


Рис. 6.13. Тканеспецифическая экспрессия гена *Cab* в целом растении. Контроль (SR1), *CaMV-cat* и семена *Cab-cat* после трехнедельного выращивания на твердой среде в присутствии (А) и в отсутствие (Б) хлорамфеникола. (ВМЦК тождественно *CaMV*.)

часть белков, обнаруживаемых в хлоропластах, кодируется ядерным геномом и до перемещения в определенную органеллу обычно синтезируется на рибосомах цитоплазмы в форме предшественников с большой мол. массой. Один из наиболее хорошо изученных белков такого типа — малая субъединица (МС) специфичной для хлоропластов рибулозо-1-5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О). Молекула данного белка состоит из двух субъединиц: большой, кодируемой геномом хлоропластов и синтезируемой в них, и малой (МС РБФК/О), синтезируемой на свободных цитоплазматических рибосомах в виде предшественника с мол. массой 20 000. В состав белка-предшественника МС РБФК/О входит транзитный пептид (мол. масса 5000—

6000), который во время транспорта в хлоропласты протеолитически отщепляется, и в результате образуется зрелая малая субъединица. Малые субъединицы затем связываются с большими с образованием зрелого фермента.

Переносу белка-предшественника МС РБФК/О в хлоропласт предшествует связывание с внешней мембраной хлоропласта. Удаление транзитного пептида осуществляют специфические для этого белка протеиназы. Молекулярный механизм данного процесса до конца не известен, однако полагают, что для взаимодействия между транзитным пептидом и оболочкой хлоропласта необходимо, чтобы в состав пептида входили основные аминокислоты, а также серин. Последовательности транзитных пептидов белков МС РБФК/О и Саb различны, что, вероятно, связано с их различной локализацией внутри хлоропласта. Однако в белках — предшественниках МС РБФК/О некоторых видов растений обнаружены гомологичные области, окружающие сайт расщепления.

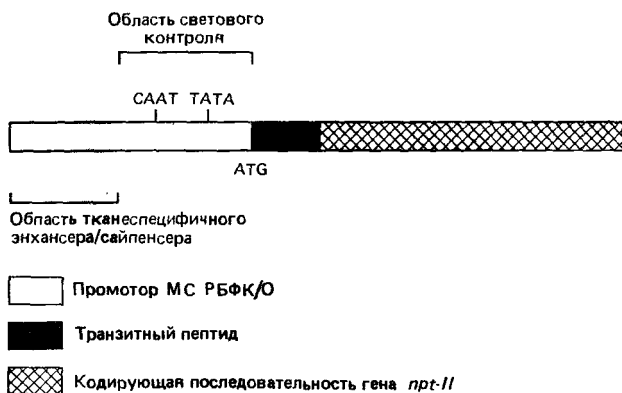


Рис. 6.14. Строение области слитого транслируемого гена МС РБФК/О-*npt-II*.

Свойства транзитных пептидов были изучены недавно путем их соединения (вместе с промоторными участками) с «индикаторным» геном (*npt-II*) [49, 54]. Таким образом исследовали:

- Тканеспецифическую экспрессию продукта гена, который переносится внутрь клетки в нужный компартмент.
- Локализацию белка в различных компартментах клетки.
- Расщепление химерного белка для удаления транзитного пептида.

В ниже описанных экспериментах (разд. 6.6 и 6.7) используют растения табака SR1, трансформированные химерным геном, сконструированным на основе гена белка МС РБФК/О пшеницы (рис. 6.14). Вся область, кодирующая этот белок, за ис-

ключением последовательности транзитного пептида и первого метионинового кодона АТГ, удалена и замещена бактериальным геном неомидинфосфотрансферазы-II (NPT-II). Область промотора МС содержит 5'-последовательность длиной 33 п. н. (включая блок ТАТА), которая делает экспрессию зависимой от света, и последовательность большего размера, тоже расположенную в 5'-области, которая представляет собой специфический для корней сайленсер.

В разд. 6.6 и 6.7 описаны методики, предназначенные для выявления локализации химерного белка в органелле, а также тканеспецифической экспрессии гена МС-*npt-II* (последовательность, кодирующая транзитный пептид МС, соединенный с геном *npt-II*, и регулируемая промотором гена МС). Для убедительности доказательства того, что транзитный пептид МС РБФК/О способен доставить NPT-II в хлоропласты, необходимо показать, что зрелая (протеолитически расщепленная) NPT-II содержится только внутри хлоропластов растений, экспрессирующих химерный ген МС-*npt-II*. Кроме того, необходимо убедиться в том, что и NPT-II, лишенная транзитного пептида, например синтезированная под контролем промотора гена *pos*, обычно не поступает в хлоропласты.

Для таких экспериментов препараты хлоропластов должны быть приготовлены из различных источников, как описано в разд. 6.6.

- Трансгенные растения табака SR1, несущие ген МС-*npt-II*.
- Трансгенные растения SR1, содержащие конститутивно экспрессируемый ген *npt-II* без последовательности транзитного пептида (*pos-npt-II*).
- Контрольные нетрансформированные растения табака SR1.

Тотальный белок, выделенный из растений каждого типа и из ткани листа, фракционируют методом электрофореза в неденатурирующем полиакриламидном геле (разд. 6.7.2) и проводят сравнение активности NPT-II методом радиоавтографии *in situ* (разд. 6.7.3).

6.6. Выделение интактных хлоропластов табака

6.6.1. Общие положения

Интактные хлоропласты можно выделить из листьев табака путем простой гомогенизации и очистки в ступенчатом градиенте плотности фикола (см. также разд. 4.5). После обработки протеиназой для удаления примесей белков цитоплазмы, включая вновь синтезированную NPT-II, хлоропласты лизируют и изучают ассоциированную с ними ферментативную активность.

Описанный ниже метод можно применять для выделения хлоропластов из многих видов растений, а также для изучения других белков хлоропластов.

6.6.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Политрон (Gallenkamp).
- Листья табака.
- A.** Растения, трансформированные геном *MS-npt-II*.
- B.** Растения, трансформированные геном *pos-npt-II*.
- B.** Контрольные растения (нетрансформированные **SR1**).
- Стерильные универсальные флаконы (Sterilin).
- Нетканый материал для фильтрования Miracloth (Calbiochem) или капрон.
- Настольные центрифуги с охлаждением и бакет-ротатором (например, Sorval).

Растворы

- 2,0 М HEPES-КОН, pH 7,5; растворяют 476,0 г в 500 мл дистиллированной H₂O. Доводят pH до 7,5 1,0 М КОН и доливают до 1 л дистиллированной H₂O.
- Пятикратный буфер для выделения хлоропластов (CIB) [1,65 М сорбитол; 250,0 мМ HEPES-КОН, pH 7,5; 5,0 мМ MgCl₂; 5,0 мМ MnCl₂; 10,0 мМ ЭДТА; 5,0%-ный (объем на объем) 2-МЭ; 2,5 мг/мл БСА]. *На 100 мл:*

Сорбитол	30,0 г
2,0 М HEPES-КОН, pH 7,5	12,5 мл
MgCl ₂ ·6H ₂ O	101,5 мг
MnCl ₂ ·4H ₂ O	98,5 мг
0,5 М ЭДТА	2,0 мл
2-МЭ	5,0 мл
БСА	250,0 мг

Хранят при —20 °С. Для получения однократного CIB используют дистиллированную воду.

- Раствор трипсина: 15 мг/мл трипсина (Sigma) в однократном CIB.
- Буфер для лизиса (25,0 мМ трис-HCl, pH 7,5; 0,5%-ный 2-МЭ; 25,0 мкл/мл ингибитора трипсина). *На 10 мл:*

2,0 М трис-HCl, pH 7,5	125,0 мкл
2-МЭ	50,0 мкл
Ингибитор трипсина (Sigma)	250,0 мкг.
- 10%- и 3%-ный фиколл (Pharmacia 17-0400-01 или Sigma F-4375) растворяют в однократном CIB.

6.6.3. Методика

Примечание: все работы проводят при 0—4°C. Все процедуры следует производить быстро и аккуратно, особенно важно нарезать лист на кусочки непосредственно перед началом гомогенизации.

Приготовление градиентов фиколла

1. Пипеткой на 10 мл осторожно (не касаясь стенок) наливают 10 мл 10%-ного раствора фиколла на дно универсального флакона.
2. Наслаивают на этот раствор 3%-ный фиколл, используя шприц на 20 мл с иглой, изогнутой в форме буквы U. 3%-ный фиколл наслаивают осторожно, поднимая иглу по мере того, как поднимается уровень жидкости. На поршень необходимо нажимать очень слабо. Граница должна быть четкой и хорошо различимой.
3. Наслаивают на 3%-ный фиколл 5 мл однократного СІВ и охлаждают до 4°C.

Следует соблюдать осторожность, чтобы не перемешать градиент при перемещении пробирок.

Приготовление образца

1. Собирают по 2 г молодых листьев каждого растения. Охлаждают в воде со льдом в течение 2—3 мин. Быстро нарезают каждый лист на маленькие кусочки новым скальпелем (лезвием), избегая сдавливания, и сразу же переносят в пластмассовые флаконы, содержащие 15 мл однократного СІВ, охлажденного до температуры льда. Измельчают на большой скорости в гомогенизаторе «Политрон» 1—2 раза по 5 с.
2. Быстро фильтруют гомогенат через два слоя Miracloth в пластмассовый флакон.
3. Осаждают неочищенный препарат хлоропластов центрифугированием (настольная центрифуга с охлаждением типа Sorval с бакет-ротором) при 3000 об/мин и 2°C в течение 3 мин.
4. Снова суспендируют осадок в 20 мл охлажденного до 4°C однократного СІВ, осторожно перемешивая его пастеровской пипеткой, и вновь осаждают хлоропласты при 3000 об/мин и 2°C в течение 3 мин.
5. Ресуспендируют неочищенный препарат хлоропластов в 2 мл однократного охлажденного СІВ (стадия 4).
6. Осторожно переносят пипеткой 2,0 мл суспензии хлоропластов на поверхность градиента фиколла и центрифугируют при 3000 об/мин и 2°C в течение 5 мин.
7. Укороченной (с широким носиком) пастеровской пипеткой

собирают нижнюю зону (на границе 10 %- и 3 %-ного фиколла) и переносят во флакон — в этой зоне содержатся интактные хлоропласты. Доводят до 20 мл холодным однократным СВ и вновь центрифугируют, чтобы осадить хлоропласты (стадия 4).

8. Удаляют супернатант, суспендируют осадок в 300 мл однократного СВ и переносят в пробирку Эппендорф.
9. Помещают на лед, добавив 3,0 мкл раствора трипсина, и оставляют на 30 мин.
10. Наполняют пробирку до верха однократным СВ. Центрифугируют в мини-центрифуге на низкой скорости 1 мин, удаляют супернатант, добавляют 100 мкл буфера для лизиса хлоропластов, который содержит ингибитор трипсина, и перемешивают. Помещают образец на лед и затем используют для определения активности NPT-II (разд. 6.7.3).

6.7. Определение активности NPT-II in situ

6.7.1. Общие положения

Радиометрическое определение активности NPT-II в экстрактах клеток прокариот

Несколько лет назад был разработан удобный и весьма чувствительный метод радиометрического анализа, позволяющий определять активность NPT в бактериальных экстрактах. При этом используют АТР, в котором фосфор концевой (γ) фосфатной группы замещен на радиоактивный изотоп ^{32}P . При ферментативной реакции NPT-II переносит радиоактивный фосфат с γ - ^{32}P АТР на антибиотик, который вследствие этого становится радиоактивным. Чтобы количественно определить продукты этой реакции, радиоактивный фосфорилированный антибиотик следует каким-либо образом отделить от высокордиоактивного АТР. Для этого используют специальную ионообменную бумагу (фосфоцеллюлозу Whatman P81), которая при pH проведения реакции связывает только антибиотик. Реакционную смесь наносят на поверхность небольшого куска бумаги и свободный АТР затем просто смывают с бумаги горячим фосфатным буфером, после чего бумагу высушивают и количество связывающейся метки определяют в сцинтилляционном счетчике.

Радиометрическое определение активности NPT-II в экстрактах клеток эукариот

К сожалению, метод, используемый для определения активности NPT-II прокариот, не может применяться для определения NPT-II в клетках эукариот. Во всех эукариотических клетках отмечается высокий уровень эндогенной АТРазной актив-

ности, которая конкурирует с NPT-II за меченый АТР. Если уровень NPT-II высок, как, например, в бактериальной клетке, то фермента достаточно для преодоления такой конкуренции и образования определяемых количеств фосфорилированного канамицина. Однако в чужеродном окружении (эукариотические клетки), когда экспрессия гена NPT-II контролируется чужеродным промотором, уровень фермента обычно значительно ниже по сравнению с конкурирующей активностью, и, следовательно, его недостаточно, чтобы преодолеть конкуренцию за АТР. В результате анализ может показать, что фермент отсутствует в экстракте.

Наиболее простой путь для преодоления этой проблемы — предварительное разделение активностей NPT-II и АТРаза. Для этого разработан ряд методов, наиболее удобный из которых основан на фракционировании с помощью неденатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле [46]. Из исследуемого материала на холоду в присутствии смеси ингибиторов протеиназ готовят бесклеточные экстракты и фракционируют их методом электрофореза. Гель, содержащий фракционированный экстракт, вынимают из прибора и уравнивают соответствующим буфером, который используют для проведения реакции. Фермент затем должен взаимодействовать с кофакторами и субстратами; это достигается путем иммобилизации их в слое агарозы, плавящейся при низких температурах. На поверхность акриламидного геля наливают агарозу, и она застывает. Реакцию проводят, как и в обычной жидкой фазе, и образующийся в результате фосфорилированный канамицин переносится затем с геля на лист фосфоцеллюлозной бумаги посредством капиллярных сил, как при блоттинге по Саузерну. Бумагу затем промывают, как описано выше, но в данном случае радиоактивный канамицин выявляют радиоавтографией. Судя по сообщениям, чувствительность данного метода позволяет в оптимальных условиях (чистый препарат фермента) обнаружить 1 нг активного фермента, но значительно снижается при использовании неочищенных препаратов. Известен и другой метод определения NPT-II с помощью специфических антител и вестерн-блоттинга (разд. 6.8).

Эксперимент, описанный в данном разделе, иллюстрирует некоторые общие положения метода на примере переноса продукта гена *MS-npt-II* в хлоропласты.

6.7.2. Неденатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Полный обзор данного метода опубликован Хэймсом [20]. В данном разделе приведено лишь схематичное его описание для определения NPT-II *in situ*. В связи с тем что при любых

Н, кроме изоэлектрической точки, белковые молекулы обладают поверхностным зарядом (причем величина этого заряда у разных белков варьирует), в электрическом поле они движутся с разными скоростями. Хотя разделить белки можно и в растворе с помощью зонального электрофореза, обычно принято использовать несущую среду. Большим преимуществом твердой фазы служит то обстоятельство, что после окончания электрофореза разделенные белки остаются на месте. Метод электрофореза в полиакриламидном геле весьма популярен для разделения сложных смесей белков и обладает многими преимуществами по сравнению с другими способами. Пористая природа геля обуславливает активное участие матрикса в разделении, и, таким образом, можно разделять молекулы с одинаковым зарядом разного размера. Кроме того, можно легко изменять размер пор в широком диапазоне значений так, чтобы он соответствовал различным задачам разделения. Если белки наносят в виде образцов большого объема, то обычно используют ступенчатые буферные системы, чтобы не ухудшалось разрешение. В такой системе образцы наносят в лунки в крупнопористом «концентрирующем» геле, заподимеризованном поверх мелкопористого «разделяющего» геля. Белки в разведенном образце быстро проходят через концентрирующий гель, но скапливаются на границе двух гелей и образуют узкую зону. Таким образом, все белки начинают перемещаться в разделяющем геле с одной и той же позиции. Для определения массы обычно используют денатурирующий полиакриламидный гель, т. е. белки диссоциируют в восстанавливающих условиях на составляющие их полипептиды с помощью детергентов, например ДСН. Этот детергент связывается с молекулами белков и выравнивает различия в зарядах; таким образом, разделение белков происходит только по размеру. Очевидно, что денатурирующие условия не подходят для анализа большинства ферментов, поскольку для сохранения каталитической активности необходимо поддерживать белок в нативном состоянии. В этих случаях используют электрофорез в геле при неденатурирующих условиях, когда разделение определяется как зарядом, так и размером молекул. При этом трудно сопоставлять размеры белков, даже если они перемещаются рядом. Полиакриламид химически инертен и, что особенно важно для определения NPT-II *in situ*, достаточно прочен, чтобы выдерживать необходимые промывания и смены буфера.

Для удобства сперва заливают разделяющий и концентрирующий гели, и, таким образом, пока они полимеризуются и охлаждаются до 4 °С, можно провести экстракцию тканей.

6.7.2.1. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Прибор для вертикального электрофореза в пластинах (например, Hoefer Scientific Instruments).
- Источник питания (2000 В, например, LKB 2197).
- 1%-ная агароза с высокой температурой плавления (например, Miles Scientific; SeaKem HGT) в дистиллированной H_2O .
- Кипящая водяная баня.
- Вакуумный насос.

Растворы

- Пятикратный буфер для электрофореза (трис-глицин, pH 8,3).
На 1 литр:

Глицин 139,6 г

Трис-ОН 15,2 г

Раствор без доведения должен иметь требуемый pH.

- Раствор акриламид/бисакриламид (30 : 0,8%). *На 1 литр:*

Акриламид(BDH) 30,0 г

Бисакриламид(BDH) 0,8 г

Следует использовать реактивы фирмы BDH степени очистки Electrap (специально очищенные для электрофореза) либо эквивалентной. Растворяют в дистиллированной H_2O и деионизуют перед использованием, перемешивая в течение 1 ч с 5 г анион-катионной смолы (Амберлит MG-1, BDH) на 100 мл раствора. Раствор фильтруют через Whatman № 1 в темную стеклянную посуду и хранят в темноте при 4°C.

- 1 М трис-HCl, pH 8,8 и 6,8. *На 1 литр:* растворяют 121,1 г трис-ОН в 800 мл дистиллированной H_2O и доводят до нужного pH концентрированной HCl. При доведении следует использовать специальный электрод для определения pH растворов, содержащих трис (Sigma). Доводят объем до 1 л дистиллированной H_2O . Эти растворы при комнатной температуре стабильны в течение нескольких месяцев.
- TEMED (Sigma): хранят в темноте при 4°C. Используют только недавно вскрытые флаконы.
- 1,5%-ный раствор персульфата аммония. *На 10 мл:* растворяют 150 мг вещества степени очистки Electrap (BDH) в дистиллированной H_2O . Готовят непосредственно перед использованием¹.

¹ Можно приготовить 10%-ный раствор персульфата аммония и хранить его при -20°C по крайней мере месяц. — *Прим. ред. пер.*

Примечание: при растворении персульфата аммония хорошего качества слышится потрескивание.

- Смесь этанол/ацетон (1:1).
- Смесь пропанол/вода (1:1).

6.7.2.3. Методика

Следует отметить, что в этой методике описано приготовление неденатурирующего геля для проведения электрофореза на холоду (4 °C), чтобы свести к минимуму потерю ферментативной активности фракционируемых белков. Тот же метод можно использовать для приготовления денатурирующего геля, если в смесь для геля добавить 1 %-ный ДСН. Электрофорез в денатурирующем геле обычно проводят при комнатной температуре. Во время работы следует надевать резиновые перчатки, поскольку акриламид представляет собой нейротоксин с кумулятивным действием и особенно опасен в виде мономера.

1. Моют стеклянные пластины сперва детергентом (например, 0,1 %-ным Деконом), затем смесью этанол/ацетон (1:1). Высушивают на воздухе.
2. Собирают блоки для геля с соответствующими слейсерами (например, толщиной 1—2 мм), удерживая их вместе клипсами (если требуется), и запаивают горячей агарозой (100 °C, 1 %) с высокой температурой плавления.
3. Смешивают в колбе Бюхнера объемом 250 мл реактивы в следующем порядке, добавляя ТЕМЕД и персульфат после дегазирования. Этой смеси достаточно для заливки 10 %-ного разделяющего геля объемом около 37 мл^{а)}.

Акриламид/бисакриламид (30:0,8 %) 13,4 мл

1 М трис-HCl, pH 8,8 15,0 л

Дистиллированная H₂O 7,0 мл

Дегазируют в течение 1 мин

ТЕМЕД 20,0 мкл

1,5 %-ный персульфат аммония 2,0 мл

4. Заливают раствор между стеклянными пластинками, оставляя пространство для помещения гребенки и заливки концентрирующего геля на толщину 2—3 см.
5. Осторожно накладывают пастеровской пипеткой 1—2 мл смеси пропанол/вода (1:1).
6. Дают гелю полимеризоваться в течение 30—60 мин, о чем можно судить по образованию четкой границы между гелем и наложенным на него раствором.
7. Отсасывают жидкость над гелем и осторожно промывают поверхность геля дистиллированной H₂O. Удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой.

8. Готовят концентрирующий гель, смешивая в следующем порядке^{а)}:

Акриламид/бисакриламид (30 : 0,8%)	2,5 мл
1 м трис-НСІ, рН 6,8	2,5 мл
Дистиллированная Н ₂ О	13,8 мл

 Дегазируют в течение 1 мин
 ТЕМЕД 5,0 мкл
 1,5 %-ный персульфат аммония 1,0 мл
9. Заливают между стеклянными пластинками раствор концентрирующего геля.
10. Вставляют гребенку (*Осторожно: акриламид может выплеснуться!*) и оставляют примерно на 15 мин^{б)} для полимеризации, контролируя этот процесс по образованию четко выраженной границы вдоль краев геля.
11. Сразу же после полимеризации удаляют гребенку и промывают лунки однократным буфером для электрофореза. Искривленные лунки следует выправить иглой от шприца.
12. Заливают в нижнюю камеру однократный буфер для электрофореза. Удаляют нижний спейсер между стеклянными пластинками и наклонно погружают их в нижнюю камеру. Удаляют все пузырьки воздуха, оказавшиеся между пластинами. Помещают пластины на подпорки на дне нижней камеры и прикрепляют к верхней камере клипсами. Заполняют верхнюю камеру однократным буфером для электрофореза.
13. Выравнивают температуру собранного прибора, поместив его на 30 мин в холодную комнату при температуре 4 °С^{в)}.
14. Осторожно наносят каждый образец (подробнее о приготовлении образцов см. в разд. 6.7.3.2) в лунки с помощью автоматической пипетки Gilson^{г)} или шприца фирмы Hamilton.
15. Проводят электрофорез (*Примечание: белки мигрируют от минуса к плюсу, см. также примечание к разд. 5.3.3*) до тех пор, пока фронт краски не окажется на расстоянии 1—2 см от дна. Гель толщиной 1,5 мм и длиной 15,0 см необходимо подвергать электрофорезу в течение 16 ч при 100 В^{д)}.
16. Отключают источник напряжения и осторожно разделяют пластины. *Примечание: во избежание повреждения в качестве рычага следует использовать тонкий шпатель.* Поместив гель на стеклянной пластинке, осторожно удаляют концентрирующий гель. При работе с гелем следует использовать безопасную бритву и обрубать, а не резать гель¹.

¹ При разрезании геля удобно использовать острое колесико с рукояткой, которое предназначено для нарезания теста для печенья. — *Прим. ред. пер.*

Примечания

- ^{a)} Для приготовления денатурирующего геля следует добавлять и 0,1% ДСН.
- ^{b)} Не рекомендуется оставлять на длительное время, поскольку гребенку будет очень трудно вынуть, не повредив при этом лунки.
- ^{c)} Электрофорез в денатурирующем геле, содержащем ДСН, обычно проводят при комнатной температуре.
- ^{d)} Некоторые гели могут оказаться слишком тонкими, чтобы можно было, не загрязняя соседние лунки, использовать для нанесения автоматическую пипетку типа Gilson. Вероятно, лучше использовать микрошприц (их выпускает фирма Hamilton) либо приспособление для нанесения с капилляром.
- ^{e)} Электрофорез в неденатурирующем геле проходит относительно медленно, поскольку в геле и буфере для электрофореза отсутствует ДСН.

6.7.3. Определение NPT-II in situ после электрофореза

6.7.3.1. Общие положения

Хотя определенные активности NPT-II in situ (см. полное описание в разд. 6.7.1) особенно удобны для изучения транзитных пептидов и в данном разделе метод иллюстрируется именно этим примером, изначально он был разработан для анализа экспрессии химерных генов *npt-II* в трансформированных клетках животных и растений [24, 46]. Такое определение является полуколичественным и позволяет выявить влияние определенного типа промотора (например, *pos* по сравнению с 35S CaMV [48]) и дозы гена [44], а также зависимость уровня экспрессии химерных генов *npt-II* в трансформированных тканях растения от положения в геноме [29, 39].

Для определения проводят электрофорез в неденатурирующем полиакриламидном геле, который подробно описан выше (разд. 6.7.2). На стадии 3 используют электрофорез в неденатурирующем 10%-ном акриламидном геле. Вся процедура занимает около 24 ч: следует приготовить гель, поместить его в прибор для электрофореза и охладить до 4 °C. Во время охлаждения готовят образцы, затем их наслаивают на гель и проводят электрофорез в течение ночи. На следующий день завершают анализ, и, если получен хороший сигнал, первые радиоавтографы могут быть готовы уже в тот же день.

6.7.3.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Холодная комната на 4 °C.

- Образцы растительной ткани: трансформанты и контроль.
- Контрольные экстракты NPT-II из бактерий (приложение 6 [II]).
- Одноразовые пластмассовые палочки (Sarstedt).
- Пластмассовая коробка (Steward plastics).
- Водяные бани на 37 °С и с кипящей водой.
- Агароза с низкой температурой плавления (2%).
- Пластика для анализа (стеклянная пластинка примерно того же размера, что и гель, к которой приделаны бортики из липкой бумажной ленты высотой 0,5 см).
- Бумага Whatman P81.
- Бумага Whatman 3 MM.
- Груз весом 1 кг.
- Обогревательная лампа или вентилятор с подогревом.
- Полимерная пленка (Saran wrap). Dow Chemical Company Ltd.
- Кассета для экспонирования рентгеновской пленки с усиливающим экраном.
- Рентгеновская пленка (например, Hyperfilm-MP фирмы Amersham).

Растворы

- Буфер для экстракции NPT-II [NEB] (10%-ный глицерин; 40,0 мМ ЭДТА; 150 мМ NaCl; 100,0 мМ NH_4Cl ; 10,0 мМ трис-HCl, pH 7,5; 3,0 мг/мл ДТТ; 0,2 мг/мл лейпептина; 0,2 мг/мл ингибитора трипсина). На 100 мл:

Глицерин (BDH Analar)	10,0 мл
0,5 М ЭДТА, pH 7,5	8,0 мл
5,0 м NaCl	3,0 мл
NH_4Cl	535,0 мг
2,0 М трис-HCl, pH 7,5	0,5 мл
ДТТ (BDH)	300,0 мг
Лейпептин (Sigma)	20,0 мг
Ингибитор трипсина (Sigma)	20,0 мг
- Фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), 40 мМ; 7,0 мг/мл в изопропанол. Хранят при -20°C . *Примечание: Внимание! ФМСФ очень ядовит.*
- Раствор БСА (10 мг/мл).
- Бромфеноловый синий (0,01%-ный в 25%-ном глицерине).
- Буфер для реакции NPT-II [NRB] (67,0 мМ трис-малат, pH 7,1; 42,0 мМ MgCl_2 , 400,0 мМ NH_4Cl).

На 1 литр:

Трис-ОН	8,0 г
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8,5 г
NH_4Cl	21,4 г

Растворяют в 500 мл дистиллированной H_2O . Доводят pH до 7,1 твердой малоновой кислотой ($CH(COOH) : CH_2COOH$). Для этого требуется 3—4 г/л. Доводят до 1 л дистиллированной H_2O .

- (γ - ^{32}P) АТР, 3000 Ки/ммоль (Amersham).
- Раствор канамицин сульфата (Sigma) (25 мг/мл).
- 2%-ная агароза с низкой температурой плавления (например, Miles Scientific: SeaPlaque LGT).
- Раствор протеиназы: трипсин (Sigma), 1 мг/мл в 1%-ном ДСН.
- Фосфатный буфер (10 mM Na_2PO_4 ; pH 7,6). *На 1 литр:*
Исходный раствор А: 0,2 M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (31,2 г/л).
Исходный раствор В: 0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (71,7 г/л).
 Смешивают 13 мл раствора А с 87 мл раствора В и доводят до 1 л дистиллированной H_2O .

6.7.3.3. Методика

Примечание: все процедуры проводят либо на льду, либо в холодной комнате при 4°C.

1. Экстрагируют каждый образец^{а)} (контроль и трансформированную ткань либо хлоропласты) в НЕВ (20 мкл на 100 мг ткани), растирая их в пробирке Эппендорф пластмассовыми палочками. Начав гомогенизацию, затем добавляют 5 мкл БСА и 2 мкл ФМСФ и продолжают гомогенизацию.
2. Центрифугируют, осаждая клеточный дебрис (3 мин в настольной центрифуге) и переносят супернатант в новую пробирку Эппендорф. Отбирают аликвоту и определяют содержание белка по Брэдфорду (приложение 6 [III]). При этом следует учитывать добавленное количество БСА.
3. Разбавляют^{а)} при необходимости образцы 0,1×НЕВ. Добавляют 1 мкл раствора бромфенолового синего, перемешивают и наносят образцы целиком в отдельные лунки охлажденного (4°C) 10%-ного неденатурирующего геля. Электрофорез проводят в холодной комнате, как описано в разд. 6.7.2.
4. Отделяют (*следует помнить: отрубать, а не резать*) концентрирующий гель и вырезают нижнюю часть разделяющего геля точно по размеру пластинки для анализа (см. стадию 6).
5. Помещают гель в пластмассовую коробку, дважды промывают его дистиллированной водой и уравнивают против 100 мл NRB^{б)} в течение 10—15 мин.
6. Переносят гель на пластинку для анализа, заливают все щели по краям расплавленной легкоплавкой агарозой и дают ей застыть.

7. Готовят раствор для заливки геля. Если поверхность геля равна $A \text{ см}^2$, то смесь следующих компонентов дает верхний слой толщиной 0,15 см:

(γ - ^{32}P) АТР	0,5 АмкКи
Канамицин сульфат	0,2 Амкл
NRB	0,075A мл
Агароза LGT	0,075A мл

Смешивают агарозу, охлажденную до 37°C , с NRB (также при 37°C) и добавляют канамицин. До заливки выдерживают при 37°C . В конце добавляют ^{32}P -АТР, тщательно перемешивают и выливают на поверхность геля.

8. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре.
9. Помещают на гель лист бумаги Whatman P81 (надписывают карандашом и отмечают ориентацию), а сверху кладут пачку из 12 листов фильтровальной бумаги Whatman 3 MM (вырезанных по размеру геля). Если бумажная лента, которой обклеена пластинка, мешает, следует обрезать скальпелем ее углы и распрямить. Сверху помещают груз весом 1 кг и оставляют для переноса на 1—3 ч^в).
10. Снимают бумагу P81, удаляют налипшую агарозу и затем инкубируют бумагу в течение 30 мин в растворе протеиназы при 60°C .
11. Промывают в течение 5 мин горячим ($80\text{—}90^\circ\text{C}$) фосфатным буфером (10 мМ, pH 7,6). Повторяют 5 раз.
12. Высушивают бумагу под сушильной лампой или горячим воздухом, накрывают пленкой и помещают на экспозицию с рентгеновской пленкой на период от 1 ч до 1 нед в зависимости от интенсивности сигнала.
13. В качестве примера рассмотрим определение активности NPT-II в тканях моркови, трансформированной pos-*npt-II*, и тканях табака, трансформированных MC-*npt-II*. В тканях моркови, трансформированных pos-*npt-II*, выявляется небольшое количество NPT-II, которая обычно обладает той же подвижностью, что и нормальный бактериальный фермент (рис. 6.15, фильтр А, дорожки 3, 4 и 1 соответственно). В тех же образцах присутствуют и другие фосфорилазы, которые в результате реакции обуславливают появление радиоактивных белков. Некоторые из этих белков обладают сильным сродством к бумаге P81 и связываются с ней, что дает на радиоавтографе неспецифические пятна. Такие пятна до отмывания можно удалить с бумаги P81, обработав ее протеиназой (стадия 10), после чего выявляется лишь фосфорилирующая активность, обусловленная NPT-II (рис. 6.15, фильтр Б).

Активность NPT-II в тотальных экстрактах листьев растений SR1, трансформированных MC-*npt-II*, очевидно, связана с двумя электрофоретически различающимися полипептидами (рис. 6.15, фильтр В, дорожка 1). Верхняя зона, вероятно, представляет собой цитоплазматическую *tp*-NPT-II (транзитный пептид с мол. массой 500—6000 плюс молекула фермента с мол.

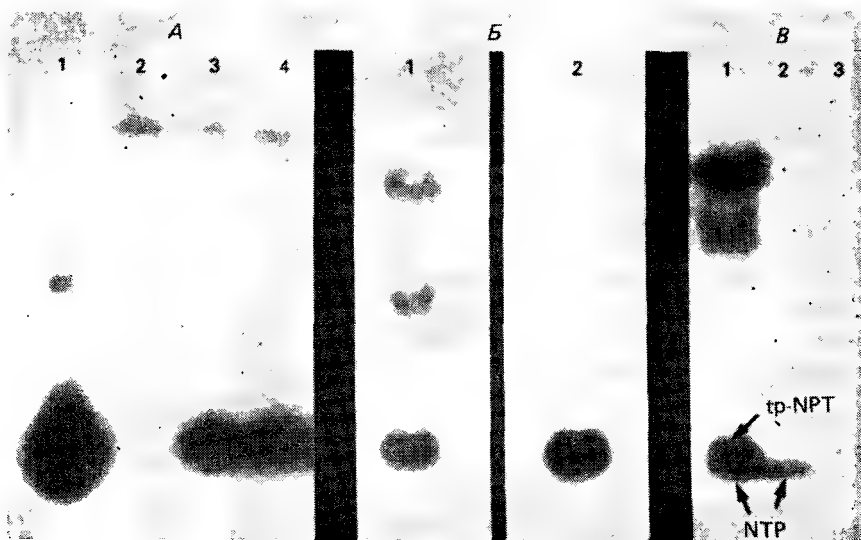


Рис. 6.15. Определение активности NPT-II *in situ*. Фильтр А: дорожка 1 — неочищенный экстракт из штамма *E. coli*, экспрессирующего ген *npt-II*; 2 — экстракт из контрольного нетрансформированного каллуса моркови; 3 и 4 — экстракты из суспензии проэмбриогенных клеток моркови, полученных из каллуса, трансформированного штаммом C58C1(pGV3850::1103) *A. tumefaciens*. Фильтр Б: удаление загрязняющих продуктов фосфокиназной реакции при обработке протеиназой. Дорожка 1 — необработанные, 2 — обработанные протеиназой. Фильтр В: использование гена *npt-II* в качестве индикаторного для выявления роли транзитного пептида при переносе продукта гена MC РБФК/О в хлоропласт и его компартментализацию. Дорожка 1 — экстракт тотального белка из растений табака MC РБФК/О-*npt-II*; 2 — экстракт из хлоропластов MC РБФК/О-*npt-II*, обработанных трипсином; 3 — аналогичным образом обработанные хлоропласты *pos-npt-II*.

массой 25 000), а нижняя зона представляет собой NPT-II, локализованную в хлоропластах и обладающую нормальной мол. массой (25 000). В пользу этого предположения говорит тот факт, что в хлоропластах растений выявляется лишь одно пятно, соответствующее активности NPT-II, и его подвижность соответствует нижнему из двух пятен. (Сравните дорожки 1 и 2 на рис. 6.15, В.) Отсутствие верхней зоны в препаратах хлоро-

пластов показывает, что в результате переноса полипептида tp-NPT-II в хлоропласты происходит удаление транзитного пептида. Этот факт тоже свидетельствует о том, что препарат хлоропластов содержит мало цитоплазматической NPT-II либо вообще не загрязнен ею.

Кроме того, результаты эксперимента показывают, что транзитный пептид избирательно направляет NPT-II в хлоропласты, поскольку препараты хлоропластов из растений MC-npt-II (рис. 6.15, фильтр В, дорожка 2) содержат гораздо более высокие уровни NPT-II , чем препараты из растений pos-npt-II (рис. 6.15, фильтр В, дорожка 3).

Примечания

- ^{a)} Выход тотального белка из каллуса табака составляет ориентировочно 20—30 мкг/100 мг ткани, а 5—10 мкг обычно достаточно для получения хорошего сигнала.
- ^{b)} Активность NPT-II зависит от ионов магния; следовательно, для того, чтобы реакция прошла эффективно, гель не должен содержать хелатирующих агентов типа ЭДТА и должен иметь достаточную концентрацию ионов магния.
- ^{b)} Для удобства перенос можно оставить на ночь.
- ^{c)} При этом удаляются все фосфорилированные белки, которые могли связаться с бумагой.

6.8. Определение NPT-II методом вестерн-блоттинга

6.8.1. Общие положения

Вестерн-блоттинг — это метод иммунологического выявления электрофоретически разделенных антигенов, связанных с твердой подложкой. В качестве подложки используют нитроцеллюлозный фильтр [8]. Разделение обычно проводят методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Такая система позволяет разделить белки по их мол. массе, что повышает ценность метода, поскольку можно получить данные об определенном антигене (никакими другими методами этого сделать нельзя). Кроме определения массы вестерн-блоттинг можно использовать для выявления антигена в изучаемом препарате белка; кроме того, можно определить его относительное содержание, а также выяснить, подвержен ли этот белок распаду.

После электрофоретического разделения белки переносят на нитроцеллюлозный фильтр путем электроблоттинга, при этом они прочно связываются с нитроцеллюлозной основой. Затем весь фильтр инкубируют в растворе с высокой концентрацией белка (обычно это БСА, а недавно стали использовать сухое молоко), чтобы блокировать неспецифическое связывание моле-

кул антител. После этого фильтр инкубируют со специфическими антителами (обычно их получают из сыворотки кроликов), которые связываются с соответствующими иммобилизованными антигенами. Образовавшийся комплекс антиген — антитело можно выявить каким-либо методом, разработанным для этой цели. Один из распространенных методов, известный как метод сэндвича, основан на использовании меченых специфических антииммуноглобулинов. Например, если специфическая к антигену сыворотка получена от кролика, то для выявления комплексов антиген — антитело используют антитела к иммуноглобулинам кролика, полученные от козы или осла. Такие антитела можно пометить различными способами: радиоизотопом (например, ^{125}I и выявить радиоавтографией) либо ферментом небольшой мол. массы (например, пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой и выявить с помощью растворимого хромогенного субстрата, в результате реакции с которым образуется нерастворимый продукт).

Известны и более простые методы выявления комплекса антиген — антитело. Например, можно пометить специфичные к антигену антитела, но для этого из соответствующей сыворотки необходимо выделить иммуноглобулины. Модифицируя метод сэндвича, можно использовать меченный ^{125}I или золотом белок А из *Staphylococcus aureus*, который специфически связывается с иммуноглобулинами.

Вестерн-блоттинг — это исключительно чувствительный аналитический метод. С его помощью в грубом белковом экстракте можно выявить до 50 нг антигена, а в более чистых препаратах и еще меньшие количества. Хотя здесь метод вестерн-блоттинга описан как альтернативный анализу *in situ* для выявления экспрессии NPT-II в трансформированных тканях (разд. 6.7.3), приведенные ниже методики можно оптимизировать для исследования многих других белков. Хорошим примером служит работа Джонниса с сотрудниками [29], где с помощью моноклональных антител к фитохрому изучали молекулярные механизмы участия фитохрома в фотоморфогенных ответах.

В данном разделе метод вестерн-блоттинга используется для выявления экспрессии гена *npt-II* в трансформированных клетках моркови [50]. Антитела к NPT-II получали из сыворотки кролика, при этом животных иммунизировали ферментом, выделенным из *E. coli* с помощью стандартных методов работы с белками (ионообменная [35] и аффинная [15] хроматография). Показано, что NPT-II выявляется в виде одной иммунореактивной зоны, обладающей той же электрофоретической подвижностью, что и исходный бактериальный фермент. Эти результаты позволяют сделать ряд заключений об экспрессии фермента в клетках растений: трансляция мРНК гена *pos-npt-II* в

клетках моркови приводит к образованию полипептида, идентичного бактериальному ферменту: фермент не подвергается никакому специфическому расщеплению или деградации, поскольку не обнаруживается каких-либо низкомолекулярных иммунореактивных зон, которые бы свидетельствовали о протеолитическом воздействии. Следовательно, NPT-II в клетках моркови может быть относительно стабильной. Эти данные противоречат результатам более ранних экспериментов по изучению стабильности NPT-II, которая экспрессируется в трансформированных клетках табака [54], или фазеолина бобов, экспрессируемого в трансформированных тканях подсолнечника [37]. В этих случаях полипептиды подвергались частичной деградации, о чем свидетельствуют зоны с меньшей мол. массой, обладающие NPT-II активностью [54], или обнаружение небольших иммунореактивных пептидов методом вестерн-блоттинга [37].

Использование вестерн-блоттинга для анализа продуктов гена позволяет относительно просто получать количественные данные. Например, установлено, что имеется прямая зависимость между уровнем экспрессии NPT-II и числом копий соответствующего гена в трансформированных клетках моркови.

Вестерн-блоттинг способствовал выявлению и видоспецифических различий в постоянных уровнях NPT-II в трансформированной ткани. Например, после неоднократных попыток не удалось иммунологически определить NPT-II методом вестерн-блоттинга в ткани листьев табака, трансформированного C58C1 (pGV3850::1103), даже в том случае, когда фермент выявлялся биохимическим методом [46]. В настоящее время причины таких различий неизвестны, однако они могут иметь важные последствия при изучении экспрессии генов в растениях и влиять на выбор модельных растительных систем.

6.8.1.1. Обеспечение

Оборудование и расходимые материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Качающаяся платформа либо медленная круговая качалка.
- Маленькая пластмассовая коробка.
- 10 %-ный неденатурирующий полиакриламидный гель (разд. 6.7.2).
- Нитроцеллюлозный фильтр (Schleicher and Schuell, BA-85).
- Прибор для полусухого блоттинга (LKB).

Растворы

- Буфер для экстракции (10% глицерина; 40,0 мМ ЭДТА; 10,0 мМ трис-НСl, рН 7,5; 3,0 мг/мл ДТТ; 0,2 мг/мл лейпептина; 0,2 мг/мл ингибитора трипсина). *На 100 мл:*

Глицерин	10,0 мл
0,5 М ЭДТА	8,0 мл
2,0 М трис-НСl, рН 7,5	0,5 мл
ДТТ	300,0 мг
Лейпептин (Sigma)	20,0 мг
Ингибитор трипсина	20,0 мг.

- 40,0 мМ ФСМФ: 7,0 мг/мл в изопропанол. Хранят при -20°C . *Внимание! ФСМФ очень ядовит.*
- Раствор БСА (10 мг/мл).
- Бромфеноловый синий (0,1% в 25%-ном глицерине).
- Буфер для переноса (TGM). *На 1 литр:*

Трис-ОН	3,0 г
Глицин	14,4 г
Метанол	200,0 мл.

- Раствор для блокирования [100,0 мМ трис-НСl, рН 9,0; 150,0 мМ NaCl; 4%-ный раствор обезжиренного сухого молока (Marvel фирма Cadbury), 0,05% твин 20]. *На 1 литр:*

2,0 М трис-НСl, рН 9,0	50,0 мл
5,0 м NaCl	30,0 мл
Сухое молоко	40,0 г
Твин 20 (Sigma)	0,5 мл.

- Раствор для разведения антител: аналогичен раствору для блокирования, но содержит 1% сухого молока.
- Забуференный трисом NaCl (TBS) (50,0 мМ трис-НСl, рН 7,4; 200,0 мМ NaCl). *На 1 литр:*

2,0 М трис-НСl, рН 7,4	25,0 мл
5,0 М NaCl	40,0 мл.

- Раствор для промывания (TBS-твин): TBS+0,1% твин 20.
- Раствор для цветной реакции состоит из трех растворов:
- A.** 3,0 мг/мл 4-хлорнафтола (Sigma) в метаноле. Готовят перед использованием. Непродолжительное время можно хранить в темноте при -20°C .
- B.** 50 мМ трис-НСl, 200 мМ NaCl. *На 100 мл:*

5,0 М NaCl	4,0 мл
2,0 трис-НСl, рН 7,6	2,5 мл.

Хранят при комнатной температуре.

- C.** 6%-ная H_2O_2 . *На 100 мл:*

30%-ная H_2O_2	20,0 мл
Дистиллированная H_2O	80,0 мл.

Хранят при 4 °С.

Смешивают непосредственно перед использованием: 1,0 мл А, 5,0 мл В, 10,0 мкл С.

Другой способ приготовления: растворяют 20 мг 4-хлорнафтола в 2,5 мл ДМСО, добавляют этот раствор по каплям при постоянном помешивании к 47,5 мл ТБС. Добавляют 15 мкл 30%-ной H_2O_2 . Используют сразу же.

- Антисыворотка кролика к NPT-II в разведении 1 : 500.
- Пероксидаза хрена, конъюгированная с IgG к иммуноглобулинам кролика, в разведении 1 : 1000 (Miles Scientific).
- 7%-ная уксусная кислота.

6.8.1.2. Методика

Метод выделения и электрофореза белков для вестерн-блоттинга аналогичен тому, который используют для определения активности NPT-II (разд. 6.7). Если необходимы количественные результаты, то в каждом образце следует определить концентрацию белка по Брэдфорду (приложение 6[III]) и провести электрофорез, нанеся на каждую дорожку известное количество белка. В предварительных экспериментах с тотальными белковыми экстрактами количество белка, наносимого на гель, должно быть относительно велико — 500—1000 мкг на дорожку. Методика, приведенная здесь, начинается с того, что берут промытый полиакриламидный гель, содержащий разделенные белки.

1. Уравновешивают гель буфером TGM в течение 30 мин при 4 °С.
2. Надев новую пару резиновых перчаток, собирают прибор для полусухого блоттинга (рис. 6.16), следя за тем, чтобы

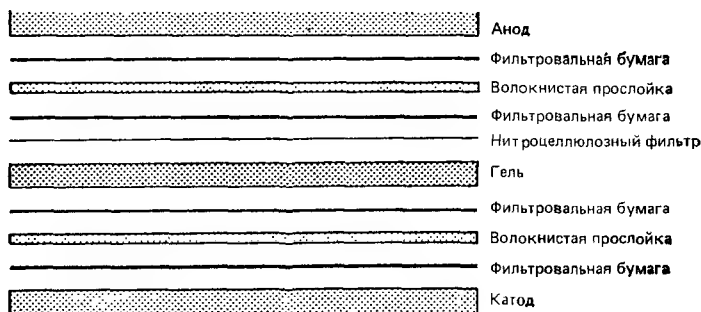


Рис. 6.16. Схема «полусухого» вестерн-блоттинга.

вся бумага и нитроцеллюлозный фильтр, ориентация которого отмечена карандашом, были тщательно смочены TGM. Помещают гель на фильтр и собирают остальную часть прибора. Между слоями удаляют пузырьки воздуха, прокатывая их большой пипеткой.

Примечание: отрицательный (—) полюс (черный) должен быть со стороны геля, а положительный (+) (красный) — со стороны нитроцеллюлозного фильтра.

3. Осуществляют перенос в течение 1 ч при 500 мА и комнатной температуре.
4. Вынимают нитроцеллюлозный фильтр из прибора и, если необходимо, проявляют^{a)} (см. стадию 10). *Примечание: для остановки реакции промывают фильтр дистиллированной H₂O.*
5. Инкубируют в растворе для блокирования (40 мл) 30 мин при 37 °С, осторожно покачивая или встряхивая.
6. После блокирования инкубируют фильтр в 25 мл раствора первых антител (антисыворотку к NPT-II разводят в 500 раз) в течение ночи при комнатной температуре, осторожно покачивая или встряхивая.
7. Промывают фильтр в течение 1 ч одним литром TBS (пять смен по 200 мл каждая).
8. Инкубируют в течение 1 ч в 25 мл раствора антител (анти-тела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена и разведенные в 1000 раз); осторожно покачивают.
9. Промывают смесью TBS-твин, как указано на стадии 6.
10. Оставляют фильтр в последнем растворе и смешивают компоненты раствора для цветной реакции. Сливают последний раствор и сразу же проявляют фильтр до тех пор, пока зоны не станут достаточно интенсивными (это может занять 5—10 мин).
11. Для остановки цветной реакции сливают раствор реагентов и погружают фильтр в 7%-ную уксусную кислоту.

Примечания

- ^{a)} Ткань растений часто содержат высокие уровни эндогенной пероксидазы, и поэтому следует поставить соответствующие контроли (нетрансформированный материал) либо необходимо выявить эндогенную активность до инкубации с антителами, просто проявив фильтр (стадии 10—11).

6.9. Получение химерных генов с последовательностями, кодирующими индикаторный фермент; система слияния с геном GUS

6.9.1. Общие положения

6.9.1.1. Слияние генов и индикаторные гены

Экспрессия генов контролируется на самых разнообразных уровнях, включая инициацию транскрипции или трансляции, процессинг, транспорт или распад мРНК либо белка. Экспрессия одного и того же гена может регулироваться на одном или нескольких уровнях, что затрудняет исследования определенного контролирующего элемента. Как же тогда изучать отдельные элементы механизма, под контролем которого находится ген? Точное слияние исследуемых генов с индикаторными представляет собой изящный метод, позволяющий упростить эту задачу. Например, для определения роли транскрипционного контроля необходимо удалить большинство или все последовательности, кодирующие белок, включая специфические сигналы для посттрансляционной модификации, и заместить их последовательностями хорошо изученного индикаторного гена.

Тот же подход используется и для изучения мультигенных семейств, продукты которых очень схожи, но по-разному регулируются в процессе развития. Сливая гены с отдельными элементами таких семейств и вводя подобные конструкции в трансгенные растения, можно изучать экспрессию генов этого семейства по отдельности.

Благодаря использованию чувствительных индикаторных ферментов в значительной степени упрощается анализ генов, подвергшихся направленному мутагенезу, если они введены в какие-либо организмы при трансформации. Если использовать индикаторный ген, кодирующий фермент, который отсутствует в изучаемом организме, то чувствительность выявления химерного гена ограничена лишь свойствами индикаторного фермента и методами его определения.

Для трансформации растений разработана система, где в качестве индикаторного используют ген β -глюкуронидазы *E. coli*. β -Глюкуронидаза (GUS, EC, 3.2.1.31), кодируемая [40] локусом *uidA*, представляет собой гидролазу, которая катализирует расщепление многочисленных β -глюкуронидов, многие из которых имеются в продаже в качестве субстратов для спектрофотометрического, флуориметрического и гистохимического анализа. Ген β -глюкуронидазы клонирован, и определена его полная нуклеотидная последовательность. Он кодирует стабильный фермент, обладающий необходимыми свойствами для создания

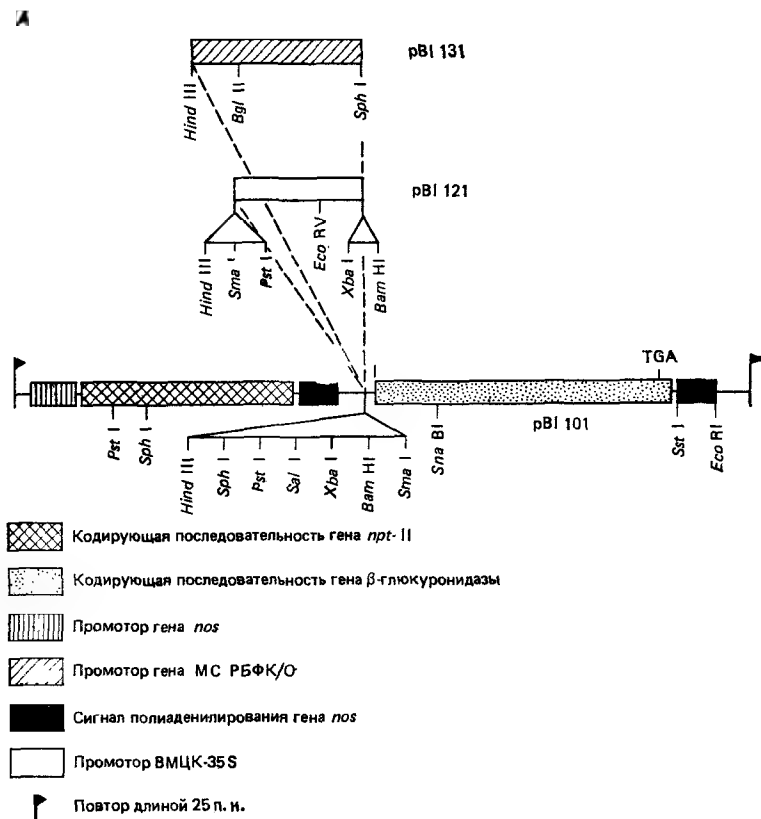
слитых генов и их анализа [26]. Ген GUS обладает рядом преимуществ по сравнению с другими индикаторными генами, используемыми для изучения растений. Во-первых, многие растения, исследованные до сих пор, не обладают глюкуронидазной активностью, и, таким образом, при изучении экспрессии химерных генов обеспечивается нулевой фон. Во-вторых, глюкуронидаза легко и без значительных материальных затрат определяется с удовлетворительной чувствительностью *in vitro* и *in situ* в гелях и достаточно устойчива, чтобы выдержать фиксацию, что позволяет гистохимически выявлять ее локализацию в клетках и на срезах тканей.

6.9.2. Слияние с геном GUS

Система слияния с геном GUS предназначена для конструирования химерных β -глюкуронидазных генов и чувствительного анализа их продуктов. У большинства высших растений, включая табак, петунию, картофель, томат, *Brassica sp.*, сою, пшеницу, ячмень и *Arabidopsis*, эндогенная β -глюкуронидазная активность низка либо полностью отсутствует [27]. Молекула фермента сохраняет активность в случае присоединения больших пептидов к N-концу, что позволяет конструировать системы слитых генов. Таким образом, этот фермент пригоден для изучения транзитных или сигнальных пептидов, ответственных за перенос как в трансгенных системах, так и *in vitro*.

6.9.2.1. Система слияния генов pBI 101 GUS

Плазмида pBI 101.1 [27] (рис. 6.17, A) представляет собой кассету GUS, лишенную промотора и встроенную в бинарный плазмидный вектор pBin19 агробактерий [3] (гл. 1). Этот вектор состоит из гена GUS плазмиды pRAJ260 (функционально идентичной плазмиде pRAJ255 [26]), соединенного по тупым концам с заполненным сайтом *Asp718* (*KpnI*) полилинкера pBin 10 (тот же, что и полилинкер pUC19). Он расположен за 260 п.н. до фрагмента *SstI*=*EcoRI*, содержащего сигнал полиаденилирования гена нопалинсинтазы Ti-плазмиды pTiT37 *A. tumefaciens* [4]. Это позволяет легко встраивать промоторы перед GUS, используя полилинкер (гл. 1), и переносить конструкции в растения, используя преимущества системы бинарных векторов. Вектор pBI 101.1 содержит сайт инициации репликации низкокопийной плазмиды RK2 и придает устойчивость к канамицину как бактериям, так и растениям. Следует предостеречь, что в связи с отсутствием «ложных» кодонов ATG во фрагменте вектора, содержащем ген GUS, для всех промоторов, клонированных в *HindIII*-сайте, могут возникать сложности,

**Б**

pBI 101.1:

AAG CTT GCA TGC CTG CAG GTC
 GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT
 GGT CAG TCC CTT ATG TTA...

pBI 101.2:

A AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT
 CTA GAG GAT CCC CGG GTA TCC CTT
 ATG TTA...

pBI 101.3:

AA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA
 CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC GGT
 CAG TCC CTT ATG TTA...

Рис. 6.17. Система слияния на основе гена GUS: А — строение основного вектора pBI 101 для слияния с геном GUS. Приведен пример его использования с двумя промоторными последовательностями растений. Б — нуклеотидная последовательность области слияния в полилинкере векторов, предназначенных для слияния с геном GUS. Инициаторные кодоны GUS выделены жирным шрифтом. Рестрикционные сайты *Bam*HI подчеркнуты.

обусловленные наличием ATG в сайте *SphI* полилинкера GCATGC.

Серия pBI 101 содержит три плазмиды, специально сконструированные для слияния генов и позволяющие получать участки соединения во всех трех рамках считывания. Векторы pBI 101.2 и pBI 101.3 представляют собой плазмиды, полученные из pBI 101.1. Эти плазмиды обеспечивают встраивание в двух других рамках считывания GUS относительно сайта полилинкера (рис. 6.17 Б).

Олигонуклеотид 5'-GATTTACGGGTTGGGGTTTCT-3' весьма удобен для определения последовательностей нуклеотидов в областях соединения гена GUS методом затравочного синтеза. Данный олигонуклеотид, содержащий 22 нуклеотида, комплементарен участку кодирующей цепи гена GUS, который оканчивается через 14 п. н. после А инициаторного кодона ATG. При слиянии генов эту затравку можно успешно применять для определения нуклеотидной последовательности обеих цепей в мини-препаратах ДНК. Такой олигонуклеотид можно использовать и для анализа химерных транскриптов методом затравочного синтеза [6].

6.9.3. Определение активности GUS в экстрактах растений

Для количественного определения и локализации GUS разработаны самые разнообразные подходы, включая спектрофотометрию, флуориметрию, идентификацию *in situ* в геле и гистохимические методы. В данном разделе описаны методы, которые могут оказаться полезными при постановке различных экспериментов.

6.9.4. Выделение GUS из тканей растений

Для определения активности GUS в тканях или культурах проводят гомогенизацию в самых различных буферах, однако наиболее успешно используют буфер, в состав которого входит 50 мМ NaPO₄, pH 7,0; 10 мМ ЭДТА; 0,1%-ный тритон X-100; 0,1%-ный саркозил; 10 мМ β-МЭ. Клетки можно разрушить с помощью френч-пресса, а также озвучивая или растирая их с кварцевым песком либо стеклянными шариками. Фирма Kontes поставляет одноразовые пестики, которые подходят к пробиркам Эппендорф, что облегчает растирание небольших образцов ткани. Способ лизиса зависит от природы и количества растительной ткани. GUS весьма устойчива к действию протеиназ, обладает длительным периодом полужизни в живых клетках и большинстве экстрактов. Тем не менее если протеиназы понижают активность фермента, то в буфер для лизиса может быть добавлен ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид — эффективный

ингибитор сериновых протеиназ) в концентрации 25 мкг/мл, который не оказывает нежелательного воздействия на GUS.

Экстракты можно длительное время хранить при -70°C без какой-либо потери активности, а также при 4°C с очень незначительным снижением активности (по крайней мере в экстрактах из листьев табака, что, разумеется, зависит от содержания протеиназы). Следует избегать хранения при -20°C , поскольку при этом, по-видимому, происходит инактивация или распад фермента, по крайней мере в том буфере для лизиса, состав которого приведен выше.

Некоторые ткани или клетки содержат большие количества эндогенных флуоресцирующих веществ или полифенолов. Такие примеси можно удалить, экстрагируя GUS буфером, в который добавлен Polyclar (нерастворимый поливинилпироллидон), с последующим пропусканием через колонку с сефадексом G-25. Поврежденные растительные протопласты, корни и другие клетки и ткани, обработанные ПЭГ или подвергнутые электропорации, могут накапливать флуорогенные соединения, которые, вероятно, представляют собой промежуточные продукты биосинтеза лигнина и других фенилпропаноидов. Эти вещества *in vivo* не флуоресцируют, но активируются при лизисе клетки, если при этом высвобождаются ферменты, способные расщеплять конъюгаты флуорохромов с гликозидами и другими компонентами, а проблема может быть устранена при центрифугировании экстрактов через микроколонки; можно проконтролировать и кинетику накопления флуорохрома, которая при наличии эндогенных флуорохромов не будет зависеть от субстрата и, следовательно, не связана с GUS.

6.9.4.1. Определение GUS в протопластах растений

Некоторые смеси ферментов, особенно Rhozyme, используемые для приготовления протопластов, содержат очень высокие концентрации β -глюкуронидазы. Обычное промывание солевым раствором и флотация в сахарозе позволяют инактивировать GUS в протопластах табака, но в случае других клеток это может вызвать значительные трудности.

6.9.4.2. Определение GUS в тканях растений, трансформированных агробактериями

Клетки агробактерий, содержащие некоторые плазмиды с геном GUS, обладают значительной глюкуронидазной активностью. Это, очевидно, вызвано сквозной транскрипцией с гена *lacZ* плазмиды pBin19 в сторону области, кодирующей GUS, с последующей инициацией трансляции с инициаторного кодона GUS. Агробактерии, не несущие таких плазмид, обладают весь-

ма низкой активностью, либо вообще лишены ее. Если кассету, содержащую ген GUS, инвертировать относительно промотора *lac*, то фоновая активность падает более чем в 20 раз (Jefferson and Green, неопубликованные данные). Следовательно, необходимо тщательно следить за тем, чтобы использовалась лишь стерильная ткань, либо ставить соответствующие контроли.

6.9.5. Флуориметрическое определение активности GUS

6.9.5.1. Общие положения

Данный метод определения весьма прост и универсален. Флуоресцентные методы в 100—1000 раз чувствительнее колориметрических (общие принципы метода описаны в литературе; см., например, [19]). Известны два основных способа флуориметрического определения GUS: 1) определение общего выхода продукта в определенный момент времени и 2) измерение кинетики активности GUS. В описанном ниже эксперименте рассматривается регулируемая светом экспрессия гена *MC-gus* по сравнению с конститутивно экспрессируемым геном *35S-SaMV-gus* в трансгенных растениях табака. Цель эксперимента — выявление регулируемой фитохромом экспрессии GUS и количественное определение GUS в зависимости от содержания ДНК (числа клеток).

6.9.5.2. Материалы

Оборудование и расходные материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I]).
- Флуориметр (например, Perkin Elmer с цифровой индикацией).
- Кварцевые кюветы (либо пластмассовые кюветы с нужными оптическими свойствами) к флуориметру.
- Длинноволновая УФ-лампа или УФ-осветитель.

Растворы

- 200 мМ NaPO₄, pH 7,0. Готовят, смешивая два исходных раствора. *Исходный раствор А*: 0,2 М NaH₂PO₄·H₂O (31,2 г/л). *Исходный раствор В*: 0,2 М Na₂HPO₄ (28,39 г/л). Для получения pH 7,0 смешивают 39 мл А с 61 мл В.
- Буфер для экстракции GUS (50 мМ NaPO₄, pH 7,0; 10 мМ ЭДТА; 0,1%-ный тритон X-100; 0,1%-ный саркозил; 10 мМ β-МЭ). На 100 мл:

200 мМ NaPO ₄ , pH 7,0	25,0 мл
0,5 М ЭДТА, pH 7,0	2,0 мл
Тритон X-100 (Sigma)	0,1 мл

Саркозил (Sigma)

0,1 г

 β -МЭ (Sigma)

69,75 мкл.

- 1 мМ 4-метилумбеллиферон (4-MU, Sigma, M-1508). Растворяют 19,82 мг динатриевой соли в 100 мл дистиллированной H_2O и хранят в темноте при 4 °С.
- Буфер для флуориметрического определения GUS. Представляет собой основной буфер для экстракции GUS с добавлением 1 мМ метилумбеллиферилглюкуронида (MUG, Sigma, M-9130). Растворяют 35,23 мг MUG в 100 мл буфера для экстракции GUS. Хранят при 4 °С максимум 2 нед.
- 0,2 М Na_2CO_3 . Растворяют 2,12 г в 100 мл дистиллированной H_2O . Раствор стабилен в течение нескольких недель при комнатной температуре.

6.9.5.3. Методика

Для анализа небольших количеств β -глюкуронидазы следует использовать 1 мМ 4-метилумбеллиферилглюкуронид (MUG), добавленный в буфер для экстракции (см. выше); конечный объем реакционной смеси 0,2 мл. Реакцию проводят при 37 °С и останавливают добавлением 1 мл 0,2 М Na_2CO_3 . Затем измеряют флуоресценцию, как подробно описано ниже.

Кроме того, можно определить кинетику реакции и построить кривую, которая намного точнее отражает активность фермента.

1. Экстрагируют ткани, как описано в разд. 6.9.4.
2. Для каждого образца предварительно инкубируют 500 мкл буфера для экстракции GUS, содержащего 1 мМ MUG, при 37 °С.
3. Готовят четыре пробирки Эппендорф, помеченные цифрами 0, 5, 10 и 15, в каждой из которых содержится по 900 мкл 0,2 М Na_2CO_3 . Это необходимо для остановки реакции в строго определенные моменты времени^{а)}.
4. Добавляют 10 мкл экстракта ткани в реакционную смесь, перемешивают и сразу же переносят 100 мкл в пробирку для остановки реакции ($t=0$). Таким образом, при определении наклона калибровочной кривой будет учтена собственная флуоресценция экстракта^{б)}.
5. Через одинаковые промежутки времени (т. е. через 5, 10 и 15 мин) отбирают аликвоты объемом 100 мкл в пробирки для остановки реакции.
6. Когда реакция закончится, просматривают пробирки с помощью длинноволнового УФ-осветителя. 4-MU должен давать голубую флуоресценцию^{в)}.
7. 4-MU имеет оптимумы возбуждения при 365 нм и излучения при 455 нм. Флуориметр следует откалибровать по свежес-

приготовленным стандартным раствором 4-метилумбеллиферона^{г)} в буфере для экстракции GUS с добавлением 0,2 M Na_2CO_3 в соотношении 1:9. Нулевая точка на флуориметре должна быть установлена относительно пробы реакционной смеси, остановленной в нулевое время^{д)}. Показания прибора совершенно линейны от предела чувствительности прибора (обычно 1 нм или менее) до 5—10 мкМ 4-метилумбеллиферона^{е)}. Измерения больших количеств при стандартном оптическом пути 1 см могут быть занижены вследствие внутренних эффектов и других факторов.

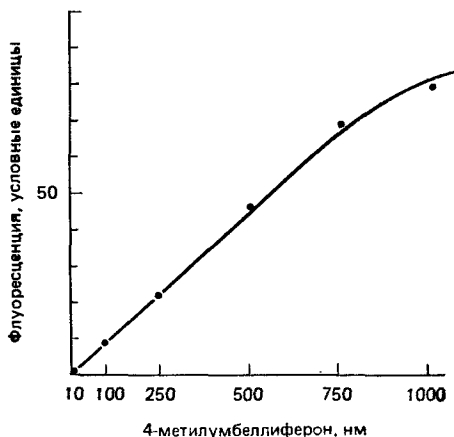


Рис. 6.18. Калибровочная кривая для определения активности GUS с использованием флуоресцирующего субстрата 4-MU.

8. Для иллюстрации чувствительности флуоресцентного анализа на рис. 6.18 приведен пример калибровочной кривой.

Примечания

- а) Добавление Na_2CO_3 преследует две цели: останавливает реакцию и до предела повышает флуоресценцию продукта, 4-MU. 4-MU содержит единственный фенольный гидроксил, который для того, чтобы молекула флуоресцировала, должен быть ионизирован. Значение pK_a этого гидроксила слегка щелочное, и, следовательно, для достижения максимальной флуоресценции раствор должен быть щелочным.
- б) Фоновая флуоресценция в экстракте часто связана с присутствием следовых количеств гидролизованного субстрата (т.е. метилумбеллиферона) в коммерческих препаратах. Для сверхчувствительных измерений можно очистить субстрат, однако на самом деле для большинства исследований это не требуется. Чтобы свести к минимуму уровень фоновой флуоресценции (4-MU в MUG), твердый MUG следует хранить в замороженном и сухом состоянии. Нельзя открывать еще холодный флакон (конденсация воды из воздуха будет способствовать гидролизу содержимого). Раствор MUG в буфере для лизиса остается пригодным при хранении в герметич-

ной посуде в течение нескольких недель, но затем начинает все сильнее флуоресцировать.

- a) Можно провести очень простой и чувствительный качественный анализ, поместив пробирку на длинноволновый ультрафиолетовый осветитель и наблюдая голубую флуоресценцию. При этом можно проводить определения в очень небольших объемах (50 мкл или менее), реакцию останавливают добавлением 25 мкл 1 М Na_2CO_3 , используя планшеты для микротитрования или пробирки Эппендорф.
- b) Готовят стандартные растворы 4-метилумбеллиферона в 0.2 М Na_2CO_3 с концентрацией до 100 нм из исходного 1 мМ раствора натриевой соли 4-MU в воде. 4-MU не обладает особенной фотолabileностью, но, по-видимому, следует оберегать его от сильного света и хранить исходный раствор в посуде с притертой пробкой.
- a) Если собственная флуоресценция экстракта вызывает серьезные затруднения, ограничивающие чувствительность определения, можно либо до начала анализа экстрагировать флуоресцирующий компонент (разд. 6.9.4), либо использовать какой-либо другой флуорогенный субстрат, синтезированный фирмой Molecular Probes Inc. В частности, из резорфинглюкуронида (ReG) образуется резорфин, квантовый выход которого необычайно высок. Длины волн его возбуждения (570 нм) и излучения (590 нм) удобны тем, что лежат в такой области спектра, где ткани растений практически не поглощают и не флуоресцируют. Кроме того, максимальная флуоресценция достигается при нейтральном pH, делая ненужной остановку реакции. Все сказанное справедливо и для 3-карбоксамбеллиферил-глюкуронида (CUG). Образующийся из этого соединения 3-карбоксамбеллиферон (3-CU) возбуждается при 400 нм и излучает при 445 нм. Преимущества 3-CU перед 4-MU состоят в том, что интенсивность его флуоресценции гораздо выше (Jefferson, неопубликованные данные). Фирма Molecular Probes Inc. скоро будет продавать CUG.
- e) Обычно измеряют активность GUS, а затем данные по каждому образцу соотносят с количеством ДНК либо хлорофилла (для изолированных хлоропластов) в экстракте. Приблизительно содержание ДНК можно оценить путем измерения флуоресценции красителя Hoechst 33258, как описано в литературе [32].

6.9.6. Выявление GUS *in situ* с использованием денатурирующего полиакриламидного геля

6.9.6.1. Общие положения

Активность GUS можно выявить *in situ* среди фракционированных белков после денатурирующего гель-электрофореза экстрактов. Такой подход помогает изучать белки, образующиеся в результате трансляционного слияния, а также посттрансляционный процессинг белков, например отщепление транзитных пептидов после переноса продукта химерного гена *cab-GUS* в хлоропласты. Аналогичный анализ химерного гена РБФК *MS-npt-II* описан в разд. 6.7, в котором и приведены более подробные детали приготовления и проведения электрофореза в ПААГ.

6.9.6.2. Обеспечение

Оборудование и расходующие материалы

- Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [1]).
- Оборудование и расходующие материалы для электрофореза в ПААГ (разд. 6.7.2.1).
- Пластмассовая коробка по размеру геля (Steward Plastics).
- Емкость со льдом достаточно большого размера, чтобы в нее помещалась пластмассовая коробка.
- Качающаяся платформа или круговая качалка с низкой скоростью вращения.
- Стеклянная пластинка того же размера, что и разделяющий ПААГ.
- Термостат на 37 °С.
- УФ-транслюминатор, дающий УФ-излучение с длиной волны около 360 нм (UV Products).
- Фотокамера «Поляроид» с фильтром «Кодак 2E Wratten» (или аналогичным).

Растворы

- Растворы для заливки 7,5%-ного ПААГ с 0,1% ДСН, как описано в разд. 6.7.2.1.

Буфер с ДСН для нанесения образца (62,5 мМ трис-НСl; 0,23 %-ный ДСН, 10 %-ный глицерин; 50 мМ β-МЭ; 0,001 %-ный бромфеноловый синий).

На 100 мл:

1 М Трис, рН 6,8	6,25 мл
ДСН (Sigma)	0,23 г
Глицерин (BDH Analar)	10,0 мл
β-МЭ (Sigma)	348,0 мкл
Бромфеноловый синий (Pharmacia)	1,0 мг.

- Буфер для экстракции GUS (разд. 6.9.5.2).
- Буфер для флуориметрического определения GUS (разд. 6.9.5.2).
- Пульверизатор с 0,2 М Na₂CO₃.

6.9.6.3. Методика

Примечание: детали проведения электрофореза в ПААГ изложены в разд. 6.7.

1. Заливают 7,5 %-ный полиакриламидный гель, содержащий 0,1 % ДСН, как описано в разд. 6.7.2.3.
2. Инкубируют экстракты растений (10—50 мкл) с равным объемом буфера для нанесения образцов, содержащего ДСН, при комнатной температуре примерно 10—15 мин.

3. Проводят электрофорез образцов при комнатной температуре в течение ночи при 50 В. Разбирают прибор, удаляют концентрирующую часть геля (разд. 6.7.2.3) и помещают разделяющую часть геля в пластмассовую коробку.
4. Осторожно промывают гель 4 раза на медленно качающейся платформе или круговой качалке в 100 мл буфера для экстракции GUS в течение 2 ч^{а)}.
5. Инкубируют гель на льду в течение 30 мин в буфере для флуориметрического определения GUS.
6. Переносят на стеклянную пластинку и удаляют весь буфер с поверхности геля^{б)}. Инкубируют при 37 °С примерно 10—30 мин (в зависимости от необходимой чувствительности).
7. Слегка опрыскивают гель 0,2 М Na₂CO₃ и осматривают его под длинноволновым УФ-трансиллюминатором (360 нм).

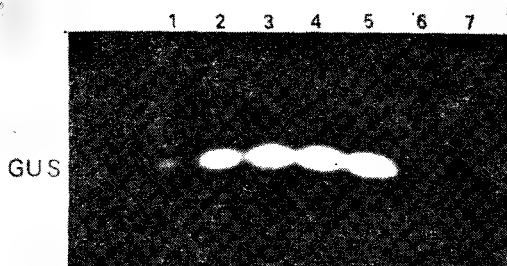


Рис. 6.19. Определение GUS в ПААГ с ДСН. Дорожки 1 и 2 — экстракты из растений табака, трансформированных *МС РБФК/О-GUS* (pBI 131). 3—5 — растения, трансформированные *СаМV-GUS* (pBI 121). Дорожки 6 и 7 — нетрансформированные растения табака.

8. Фотографируют гель, используя фильтр «Кодак 2E Wratten». Чувствительность такого определения достаточно высока, чтобы обнаружить до 0,2 нг GUS; это сравнимо с чувствительностью вестерн-блоттинга^{в)}.
9. Пример эксперимента по выявлению GUS *in situ* в полиакриламидном геле, содержащем ДСН, приведен на рис. 6.19. Хорошо видно, что активность GUS в растениях *СаМV-GUS* (дорожки 3—5) значительно выше, чем в растениях, трансформированных *РБФК МС-GUS* (дорожки 1 и 2); эти данные иллюстрируют относительную силу двух различных промоторов. Следует отметить, что табак дикого типа не содержит GUS (дорожка 7).

Примечания

^{а)} При необходимости эту стадию можно проводить при 4 °С.

^{б)} Для получения максимальной чувствительности и разрешения важно, что-

- бы инкубация при 37 °С протекала без жидкости на поверхности геля, поскольку продукт реакции хорошо растворим и будет диффундировать.
- а) Следует отметить, что определение мол. массы химерных белков GUS не всегда надежно и интерпретация различий в размерах таких химерных продуктов может быть затруднена.

6.9.7. Гистохимическое выявление GUS на срезах тканей растений

6.9.7.1. Общие положения

Следует отметить, что интерпретация данных при количественном определении активности химерных генов гистохимическими методами — непростая задача. Необходимо учитывать самые разнообразные факторы [43], однако при должной осматрительности гистохимические методы могут служить эффективным инструментом для изучения дифференциальной экспрессии генов в отдельных клетках и различных типах клеток, входящих в состав ткани.

Условия фиксации различны в зависимости от типа ткани и ее проницаемости для фиксатора. Например, глутаровый альдегид с трудом проникает в кутикулу листа, но очень быстро — в поперечные срезы стебля.

По-видимому, если после фиксации 2,5%-ным глутаральдегидом в 0,1 М NaPO₄ (рН 7,0) в течение 2—3 мин на льду предусмотрено тщательное отмывание, то в ткани остается достаточное количество GUS. Способ фиксации следует эмпирически подбирать для каждой новой системы. Формальдегид может оказаться более мягким фиксатором, чем глутаральдегид, и в нем можно проводить фиксацию дольше.

Наилучшим субстратом для гистохимического выявления β-глюкуронидазы в тканях и клетках служит 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронид (X-GLUC). При реакции с данным субстратом в области локализации фермента образуется голубой осадок, но, к сожалению, этот субстрат довольно дорог. На точность определения GUS влияют многие факторы, и для их нейтрализации необходимо хорошо понимать ход реакции. Соединение, образующееся при взаимодействии глюкуронидазы с X-GLUC, не окрашено. Для образования нерастворимого и ярко окрашенного в голубой цвет конечного продукта индоксильное производное, образующееся в ходе реакции, должно подвергнуться окислительной димеризации. Такая димеризация стимулируется атмосферным кислородом и может быть в значительной мере усилена при использовании катализатора окисления, например, смесью феррицианида и ферроцианида калия [43]. Результаты часто оказываются очень хорошими и без применения данного катализатора, однако необходимо иметь в виду, что пе-

роксидазные примеси могут усилить видимую активность глюкуронидазы. Вероятность появления окрашивания в местах, где фермент отсутствует, очень мала, однако относительная интенсивность окрашивания не обязательно отражает различия в концентрации β -глюкуронидазы.

Другой способ гистохимического определения GUS основан на использовании нафтол-ASBI-глюкуронида, при расщеплении которого образуется свободный нафтол-ASBI. Последний затем связывается с диазокрасителем.

Ниже описан метод, успешно используемый для выявления GUS на срезах трансгенных растений табака; срезы получали вручную.

6.9.7.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

- Опасная бритва.
- Эксикатор и источник вакуума.
- Предметные и покровные стекла.
- Микроскоп.

Растворы

- 0,5 М MES, pH 5,6. *На 100 мл:* растворяют 9,76 г MES (Sigma, по кат. № M-8250) в 80 мл дистиллированной H_2O . Доводят pH до 5,6 NaOH и доливают до 100 мл. Хранят при комнатной температуре..
- Раствор для фиксации и (0,3%-ный формальдегид; 10 мМ MES, pH 5,6; 0,3 М маннитол). *На 100 мл:*

Формальдегид (40%-ный раствор; BDH)	750,0 мкл
0,5 М MES	2,0 мл
Маннитол	5,46 г.

Хранят при комнатной температуре под тягой в течение 3 мин либо до появления осадка.

- 50 мМ $NaPO_4$, pH 7,0 (разд. 6.9.5.2).
- Гистохимический реактив [2 мМ 5-бром-4-хлор-3-индолил-глюкуронид (X-GLUC) в 50 мМ $NaPO_4$, pH 7,0]. *На 10 мл:* растворяют 10 мг X-GLUC (Research Organics) в 100 мкл диметилформамида в пробирке из пирекса. Доводят до 10 мл 50 мМ $NaPO_4$, pH 7,0. Каждый раз готовят свежий раствор. Сухой X-GLUC хранят в эксикаторе при -20 или $-70^\circ C$.
- 7%-ный этанол.

6.9.7.3. Методика

1. Приготавливают вручную бритвой тонкие срезы нефиксированных стеблей и черешков листьев растений, выращенных *in vitro*. Некоторые детали приготовления срезов раститель-

ного материала для гистохимического исследования приведены в литературе [41], и их следует придерживаться при работе с материалом другого типа.

2. Помещают срезы в раствор для фиксации и быстро (1 мин) пропитывают им ткани с помощью отсоса.
3. Инкубируют в фиксаторе в течение 45 мин при комнатной температуре и затем несколько раз промывают в 50 мМ NaPO_4 , pH 7,0.
4. Переносят срезы в 1—2 мл раствора гистохимического реактива (X-GLUC) и затем инкубируют при 37 °С от 20 мин до нескольких часов (в зависимости от интенсивности окрашивания). Известны и другие методы окрашивания^{а), б)}.
5. После окрашивания промывают срезы 70%-ным этанолом в течение 5 мин, затем помещают на предметные стекла и просматривают под микроскопом.

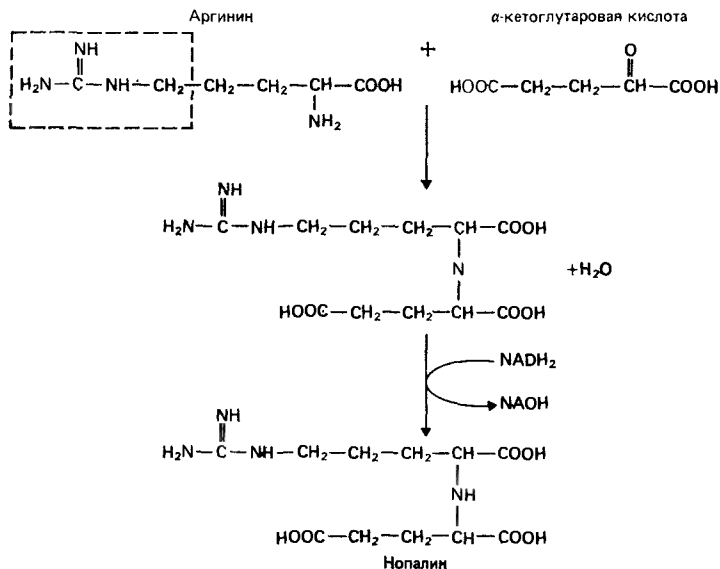
Примечания

- а) Вместо X-GLUC для гистохимической реакции можно использовать нафтол-ASBI-глюкуронид, как описано ниже [27]. Инкубируют ткани или готовые препараты, зафиксированные формальдегидом или глутаральдегидом в 0,1 М NaPO_4 (pH 7,0) с добавлением 1 мМ нафтол-ASBI-глюкуронида во влажной камере при 37 °С. Если фермента очень мало, может возникнуть необходимость в более длительной инкубации, однако при этом продукт реакции диффундирует и точность выявления снижается. Образцы промывают фосфатным буфером и обрабатывают диазотирующим красителем в фосфатном буфере. После реакции азосочетания хорошие результаты можно получить, обрабатывая срезы приблизительно 1 мин раствором Fast Garnet GBC (1 мг/мл в фосфатном буфере, pH 7,0); затем срезы промывают и готовят препараты для световой микроскопии.
- б) Кроме того, условия, приведенные в изложенной выше методике, могут быть изменены в зависимости от типа ткани:
 - 1) X-GLUC можно использовать, начиная от концентраций 1—2 мМ в фосфатном буфере (50 мМ NaPO_4 , pH 7,0).
 - 2) Время инкубации можно увеличить (например, провести ее в течение ночи). С увеличением продолжительности анализа точность выявления снижается незначительно.
 - 3) Рекомендуется использовать катализаторы окисления, например смесь 0,1 мМ феррицианида калия и 0,1 мМ ферроцианида калия. Катализатор незначительно подавляет активность фермента, но выявление продукта при этом иногда улучшается. Чтобы в какой-то степени уменьшить эффект ингибирования, оказываемый катализатором, в инкубационную смесь можно добавить 1 мМ ЭДТА. После окрашивания среза ткани во многих случаях, по-видимому, контраст повышается при освещении 70%-ным этанолом.

6.10. Определение нопалина в трансформированных растительных тканях

6.10.1. Общие положения

Одна из наиболее подробно изученных функций Т-ДНК в опухолях корончатых галлов — экспрессия транскрипта 3, который в опухолях октопинового и нопалинового типа кодирует опинсинтазу. Нопалинсинтаза катализирует синтез нопалина из аргинина и α -кетоглутаровой кислоты (рис. 6.20). Данный фер-



Гуанидиновая группа окрашивается фенантрехиноном

Рис. 6.20. Биосинтез нопалина.

мент широко используется в экспериментах по транскрипции как селективный маркер. Среди генов Т-ДНК нуклеотидная последовательность гена нопалинсинтазы была определена первой. Оказалось, что его промотор сходен с эукариотическим и в состав гена нопалинсинтазы входят последовательности, обеспечивающие полиаденилирование. Эти особенности впоследствии использовались для конструирования многих химерных генов и было показано, что они контролируют экспрессию генов в трансформированных тканях растений [24]. С помощью простого электрофоретического анализа на бумаге по наличию нопалина можно проводить отбор трансформированного растительного материала из самых разнообразных источников. Ткани сперва на-

сыщают аргинином и α -кетоглутаровой кислотой. Затем избыток аргинина отмывают, ткани подсушивают фильтровальной бумагой и размалывают. Грубый экстракт вместе с аргининовым и нопалиновым контролями наносят на бумажную электрофореграмму и для разделения аминокислот подвергают электрофорезу. Вещества, имеющие гуанидиновую группу (рис. 6.20), такие, как аргинин и нопалин, визуализируют с помощью метода чувствительного флуоресцентного окрашивания, при котором используют фенантрехинон.

6.10.2. Обеспечение

Оборудование и расходные материалы

Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований (приложение 1 [I])

- Прибор для горизонтального электрофореза на бумаге (Shandon или аналогичный).
- Кювета для окрашивания электрофореграммы (Shandon).
- Фен и держатель для него.
- Магнитная мешалка.
- Тяга.
- Пластмассовые одноразовые палочки (Sarstedt).
- Микрокапилляры (20 по 5 мкл и 5 по 1 мкл; Drummond Scientific).
- Хроматографическая бумага Whatman 3MM.
- Фильтровальная бумага с полиэтиленовой подстилкой (Benchkote) (25×30 см).
- Стакан для отходов на 250 мл.
- Промывалка с дистиллированной водой.
- Вата.
- Пластмассовое чайное ситечко.
- Термостат на 25 °C.
- Образцы растительной ткани.

Растворы

- Инкубационная смесь для нопалинового теста (NIM) (10 мМ аргинина и 10 мМ α -кетоглутаровой кислоты в MSP1). На 100 мл:

Аргинин	210,0 мг
α -Кетоглутаровая кислота	168,0 мг.

Растворяют в среде MSP1 (приложение 2 [II]). Хранят при —20 °C.

- Стандартные растворы аргинина и нопалина (Sigma): растворяют в дистиллированной воде в концентрации 1 мг/мл.

- При -20°C растворы стабильны в течение нескольких лет.
- Буфер для электрофореза (муравьиная кислота/уксусная кислота/вода, 5:15:80). На 1 литр:

Муравьиная кислота (BDH)	50,0 мл
Ледяная уксусная кислота (BDH)	150,0 мл
Дистиллированная H_2O	800,0 мл.

Если буфер хранят в посуде с притертой пробкой, он остается стабильным в течение нескольких месяцев и после перемешивания может использоваться многократно.

Примечание: необходимо работать под тягой в перчатках и фартуке, поскольку буфер для электрофореза представляет собой сильную кислоту, и его пары оказывают раздражающее воздействие.

- Растворы для окрашивания гуанидиновой группы: непосредственно перед использованием готовят свежие растворы:
- A:** 2 мг фенантренихинона (BDH) в 10 мл 100%-ного этанола.
- B:** 1 г NaOH в 10 мл 60%-ного этанола.
- Вносят 2 мг фенантренихинона (BDH) в 10 мл 100%-ного этанола в пластмассовой пробирке и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения. В отдельной пробирке растворяют 1 г NaOH в 10 мл 60%-ного этанола. Вливают раствор NaOH в раствор фенантренихинона, закрывают крышкой, перемешивают и затем выливают в кювету для окрашивания. Следует соблюдать осторожность, поскольку раствор очень едкий.

6.10.3. Методика

1. Собирают 100—200 мг изучаемой ткани, помещают ее в пробирку Эппендорф, содержащую 500 мкл NIM и инкубируют в течение ночи при 25°C .
 2. Промывают ткань дистиллированной водой (в сите над стаканом для слива отходов) и подсушивают материал.
 3. Гомогенизируют ткань в пробирке Эппендорф пластмассовой палочкой.
 4. Осаждают клеточный дебрис (2 мин на высокой скорости в мини-центрифуге) и используют супернатант, как описано на стадии 6^a).
 5. Работая на новом куске фильтровальной бумаги с полиэтиленовой подстилкой (Benchkote), размечают и складывают хроматографическую бумагу, как показано на рис. 6.21. Наносят образцы, отступая 3,5 см от анода, на расстоянии 1 см друг от друга в порядке, предложенном в табл. 6.3. (*Примечание: все пометки делать мягким карандашом.*)
- а) Заполняют микрокапилляр на 5 мкл экстрактом ткани.

б) Наносят пятна по возможности меньшего размера, несколько раз касаясь капилляром фильтровальной бумаги, пока весь экстракт не выйдет из него под действием капиллярных сил. Работают под струей теплого воздуха из фена.

в) После высыхания добавляют к соответствующим пятнам по 1 мкл стандартного раствора **нопалина** или **аргинина** (1 мг/мл)^{б)}.

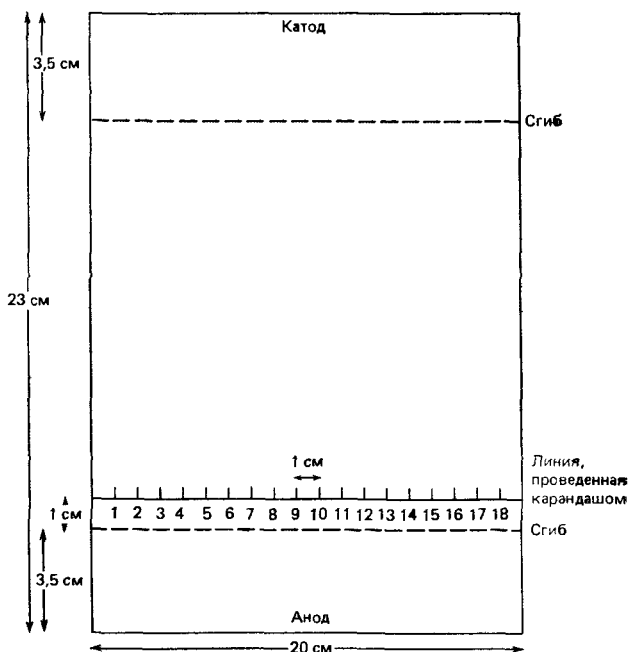


Рис. 6.21. Разметка бумаги для определения опина путем электрофореза.

6. Работая под тягой, вносят по 500 мл буфера для электрофореза в каждую камеру^{в)}. Следует убедиться, что источник напряжения подключен и контакты погружены в буфер.
7. Работая в перчатках под тягой на новом листе фильтровальной бумаги с полиэтиленовой подстилкой (Велчкотте), увлажняют электрофореграмму буфером для электрофореза с помощью ваты, стараясь не задеть полоску у старта шириной 1 см. Быстро помещают бумагу в прибор для электрофореза, расположив зону старта со стороны анода (+). Следует убедиться, что концы бумаги полностью погружены в буфер и в других точках бумага не соприкасается с буфером. Постепенно выводят напряжение до 400 В и проводят электрофорез в течение 45 мин.

Таблица 6.3. Порядок нанесения образцов на электрофореграмму для определения опина (рис. 6.21).

Дорожки	Образец (5 мкл)	Стандартные растворы (1 мкл)
1	—	Аргинин+нопалин
2	Полож. контроль (опухоль Нор ⁺)	—
3	Полож. контроль (опухоль Нор ⁺)	Нопалин
4	Отриц. контроль (нетрансформированная ткань)	—
5	Отриц. контроль (нетрансформированная ткань)	Нопалин ^{б)}
6	Трансформант 1	—
7	Трансформант 1	Нопалин
(Дорожки 8—13 наносятся в том же порядке, что и дорожки 6 и 7 с экстрактами других трансформированных тканей)		
41	—	Аргинин

8. После окончания электрофореза высушивают бумагу (зоной старта вверх) в струе теплого воздуха под тягой.
9. Пока электрофореграмма подсыхает^{г)}, готовят растворы для окрашивания **А** и **В**.
10. Смешивают по 10 мл каждого реагента **А** и **В** в кювете для окрашивания и проявляют электрофореграмму, осторожно протягивая бумагу через краситель зоной старта вперед. Затем электрофореграмму следует повесить для просушки под струей холодного воздуха под тягой (зоной старта вверх) на 20 мин.
11. Просматривают электрофореграмму при УФ-освещении и фотографируют камерой «Поляроид», снабженной оранжевым фильтром. Нопалин и аргинин дают зеленую флуоресценцию, которая при освещении дневным светом быстро пропадает.
12. Пример электрофореграммы при определении нопалина приведен на рис. 6.22. Следует отметить более низкую подвижность нопалина в неочищенных экстрактах растений по сравнению со стандартами. Негативный контроль не содержит нопалина (дорожка 4). Предполагаемый трансформант 1 (дорожки 6 и 7) содержит некоторое количество нопалина, а предполагаемый трансформант 2 не содержит. Последнее свидетельствует о том, что либо это не трансформант, либо ген нопалинсинтазы по каким-то причинам не активен.

Примечания

- ^{а)} Если супернатанта получилось мало, следует еще раз гомогенизировать материал и размешивать дольше. Если ткани очень плохо экстрагируют-

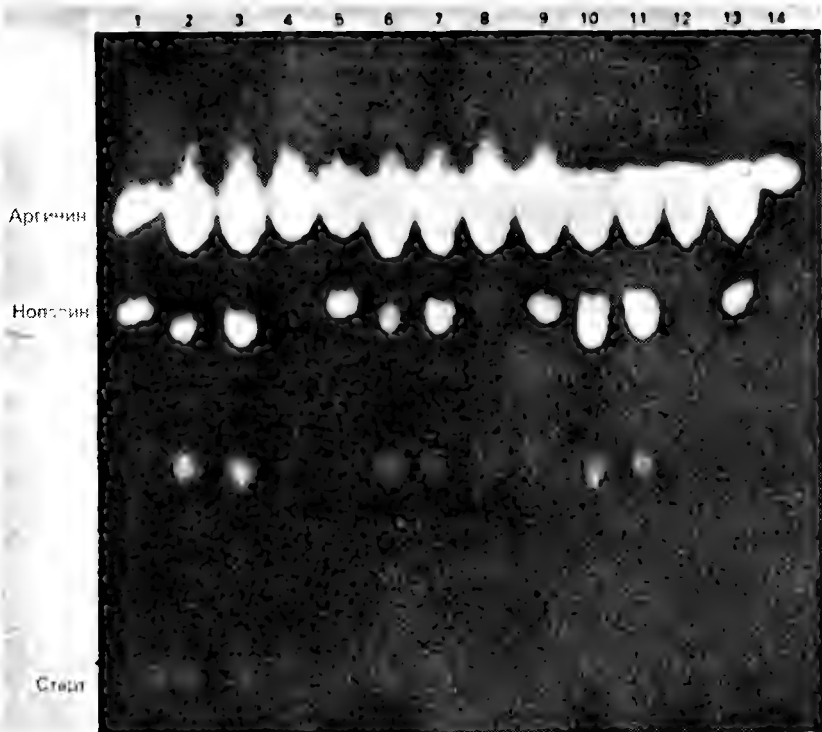


Рис. 6.22. Определение нопалина в трансформированных тканях растений. Дорожка 1 — нопалиновый и аргининовый стандарты; 2 — положительный контроль (сплухолевая ткань, синтезирующая нопалин); 3 — то же, что и 2 с добавлением нопалина; 4 — отрицательный контроль (нетрансформированная ткань); 5 — то же, что и 4 с добавлением нопалина; 6 — предположительный трансформант 1; 7 — предположительный трансформант 1 с добавлением нопалина; 8—13 — как 6 и 7 с другими экстрактами предположительно трансформированных тканей, через дорожку в образцы добавлен нопалин, 14 — аргининовый стандарт.

ся, перед повторным растиранием можно добавить небольшое количество дистиллированной воды (5—10 мкл).

- *) Нопалин в параллельные пробы добавляют для того, чтобы оценить снижение подвижности этого вещества в присутствии неочищенного растительного экстракта. Это обусловлено взаимодействием в экстракте нопалина с углеводами, а также иными аминокислотами, чем аргинин и нопалин. Поскольку в экстрактах содержатся вещества, способные к флуоресценции (при освещении УФ), и другие соединения, содержащие гуанидин, вполне точно определить подвижность нопалина в неочищенных экстрактах, чтобы отличить его от различных загрязняющих пятен.
- *) Буфер для электрофореза очень кислый и образует вредные пары, поэтому все работы следует проводить под тягой.
- *) Перед окрашиванием электрофореграмма должна быть абсолютно сухой.

Приложение 6 [I]

Нозерн-блоттинг

Данный метод можно использовать как для исследования тотальной РНК, так и poly(A)⁺-РНК. Размер РНК определяют относительно зон рибосомной РНК. На гель просто наносят дополнительную дорожку тотальной РНК, после электрофореза отдельно окрашивают ее бромистым этидием и фотографируют рядом с линейкой.

Обеспечение

Оборудование и расходимые материалы

- Тяга.
- Агароза (Miles Scientific: SeaPlaque HGT).
- Водяные бани на 55 и 60 °С.
- Нитроцеллюлозный (Schleicher and Schuell, BA-85) или нейлоновый фильтр (Hybond-N).
- Прибор для горизонтального электрофореза и источник питания.
- Тотальная РНК для определения мол. массы^{a)}.

Растворы

Все реактивы, за исключением указанных особо, поставлены фирмой BDH Analar.

Десятикратная MOPS (морфолинопропансульфоновая кислота) (20 мМ Na MOPS, 90 мМ ацетат натрия, 10 мМ Na₂ЭДТА). На 1 литр:

Na MOPS	41,86 г
Ацетат натрия	7,40 г
Na ₂ ЭДТА	3,72 г.

Доводят pH до 7,0 NaOH. Хранят в темноте при 4 °С.

- Формальдегид: 37%-ный раствор (12,3 М) в дистиллированной H₂O. pH не должен превышать 4,0.
- Диметилсульфоксид (ДМСО): деионизуют, перемешивая в течение 1 ч с 5 г амберлита (BDH). Фильтруют через Whatman №1 и хранят при 4 °С.
- Буфер с хлористым литием (1,0 М LiCl; 0,05 М ЭДТА; 2%-ный ДСН; 0,01 М трис-HCl, pH 6,5). На 100 мл:

LiCl	4,2 г
0,5 М ЭДТА	10,0 мл
ДСН	2,0 г
2 М трис-HCl, pH 6,5	0,5 мл.

— Буфер для денатурации:

Буфер с хлористым литием	1 объем
Деионизованный ДМСО	9 объемов.

— Буфер для нанесения на гель (25%-ный глицерин, 25 мМ ЭДТА, 0,5%-ный ДСН, 0,4%-ный бромфеноловый синий).
На 20 мл:

Глицерин	5,0 мл
0,5 М ЭДТА	1,0 мл
10%-ный ДСН	1,0 мл
1%-ный бромфеноловый синий	8,0 мл.

— Двукратный SSC (разд. 5.4.2).

Методика

1. Готовят гель, расплавив^{б)} агарозу^{в)} в H_2O , охлаждают до 60 °С и добавляют 10×MOPS до получения однократного раствора и формальдегид до конечной концентрации 2,2 М. Например, на 100 мл 1,5%-ного геля:

Агароза (1,5 г) в	73,0 мл дистиллированной H_2O
10×MOPS	10,0 мл
Формальдегид	16,6 мл.

Работая под тягой, тщательно перемешивают и заливают гель. Толщина геля должна составлять 3—5 мм. Заливать следует как можно быстрее, чтобы избежать чрезмерного испарения формальдегида.

2. Готовят образцы РНК (5—20 мкг тотальной РНК или 50—100 нг poly(A)⁺-мРНК в 4 мкл стерильной дистиллированной H_2O), добавив 9 объемов буфера для денатурации. Нагревают до 55 °С в течение 15 мин. Непосредственно перед нанесением проб на гель добавляют 0,25 объема буфера для нанесения^{г)}.

3. Проводят электрофорез при 150 мА до тех пор, пока фронт красителя не достигнет конца геля (для 2%-ного геля около 3 ч).

4. Отрезают дорожку с маркерами для окрашивания^{д)}. Промывают оставшийся гель (*осторожно, поскольку гели с формальдегидом хрупкие*).

5. Переносят РНК на нитроцеллюлозный фильтр методом капиллярного блоттинга (разд. 5.4)^{е)}.

6. Снимают фильтр, высушивают его на воздухе и прогревают в вакуумном шкафу в течение 1 ч при 80 °С^{ж)}.

7. Гибридизуют с меченной ДНК пробой, как описано в разд. 5.5. Проба должна быть помечена, как описано в разд. 5.6.

Примечания

а) В следующей таблице приведены примерные размеры (они варьируют у разных видов) рибосомных РНК, обычно выявляемых при разделении в агарозе тотальной РНК. См. также [18].

	рРНК	Примерное число нуклеотидных пар (п. н.)
28S/25S	(цитоплазматическая)	3580
23S	(хлоропластов)	2890
18S	(цитоплазматическая)	1926
5S	(цитоплазматическая или хлоропластов)	120 или 122.

- б) Для приготовления агарозных гелей большей концентрации агарозу, чтобы она не пригорала, следует расплавлять на кипящей водяной бане¹.
- в) Обычно 1,0—2,0%. Подробнее о фракционирующих свойствах гелей с различными концентрациями агарозы, содержащих формальдегид, см. в литературе [33].
- г) Во избежание диффузии формальдегида гели следует погружать в однократный раствор MOPS только непосредственно перед нанесением.
- д) Часть геля окрашивают в течение 30—60 мин в 50—100 мл раствора бромистого этидия 5 мкг/мл. Обесцвечивают в дистиллированной H₂O (1—2 ч или, если удобнее, в течение ночи) и визуализируют РНК под УФ-трансиллюминатором.
- е) Для нозерн-блоттинга пригодны и нейлоновые фильтры, например Nybond-N.
- ж) После длительного прогрева нитроцеллюлозный фильтр становится хрупким.

¹ Удобнее это делать в микроволновой печи. — Прим. ред. пер.

Примечание переводчика

Названия «Нозерн»- и «Вестерн»-блоттинг возникли как игра слов. Дело в том, что фамилия исследователя, разработавшего метод переноса ДНК на нитроцеллюлозный фильтр, на русский язык переводится как «Южный» (Southern). Когда появился метод переноса РНК на фильтр, ему в шутку было дано как бы противоположное название — «Нозерн» (Северный). После разработки метода переноса белков опять пришлось вспомнить стороны света, и появилось название «Вестерн» (Западный). Интересно, появится ли «Истерн»-блоттинг, а если появится, то где — на Западе или на Востоке.

Приложение 6 [II]

Выделение NPT-II и CAT из бактерий

Ферменты NPT-II и CAT можно выделить из штаммов *E. coli*, содержащих многокопийную плазмиду с соответствующими генами. Можно использовать и плазмиды, содержащие эти гены в транспозонах: Tn5 и Tn9 для NPT-II и CAT соответственно. В связи с тем что в таких штаммах уровни экспрессии

весьма высоки, в большинстве случаев достаточно просто озвучить культуру бактерий на стадии экспоненциального роста и использовать неочищенный экстракт.

Примечание: всю работу следует проводить при 4 °С.

1. Выращивают 20 мл бактериальной культуры с антибиотиком (100 мкг/мл канамицина или 25 мкг/мл хлорамфеникола) до плотности 4×10^8 клеток/мл и собирают клетки центрифугированием (7000 об/мин, 20 мин).
2. Ресуспендируют клетки в 500 мкл 10 мМ трис-НСl (рН 7,4), 10 мМ $MgCl_2$, 25 мМ NH_4Cl , 0,6 мМ 2-МЭ (или 2,0 мМ ДТТ).
3. Озвучивают на льду импульсами 3×5 с; в промежутках охлаждают на льду в течение 2—3 мин.
4. Центрифугируют для удаления дебриса (16 000 об/мин).
5. До использования хранят при -20 °С.

Приложение 6 [III]

Определение концентрации белка по Брэдфорду

При необходимости концентрацию белка можно определить в реакции Брэдфорда [7]. Раствор для определения готовят следующим образом: 100 мг кумасси синего G-250 растворяют в 50 мл 95 %-ного этанола и 100 мл 85 %-ной (вес на объем) фосфорной кислоты, затем доводят до 1 л дистиллированной H_2O . Раствор оставляют на ночь и затем фильтруют через фильтровальную бумагу Whatman № 1.

Для каждого определения используют компоненты в следующем соотношении:

Образец	100 мкл
Дистиллированная H_2O	1 мл
Раствор для определения	1 мл

Определяют поглощение пробы при 595 нм. Строят калибровочную кривую, используя БСА в концентрациях от 0 до 100 мкг.

Приложение 6 [IV]

Определение агропина и маннопина

Некоторые виды растений трансформируют с использованием штаммов *A. rhizogenes*, несущих бинарные векторы (приложение 2 [VIII]). Агропин и маннопин (в зависимости от штамма) представляют собой удобные маркеры для выявления Ri-генов Т-ДНК в клонах тканей и растений, регенерировавших из опухолей косматых корней. Метод достаточно чувствителен и за-

ключается в проведении простого электрофореза на бумаге; оборудование и растворы те же, что и для определения нопалина (разд. 6.10). Агропин и маннопин — это производные сахаров, и для их определения используют нитрат серебра.

1. Растирают 50—100 мг свежей ткани в пробирке Эппендорф с равным объемом этанола. Альтернативный путь — дважды экстрагируют 10 мг ткани 40 мкл дистиллированной H_2O в течение 10 мин.
2. Центрифугируют экстракт в мини-центрифуге в течение 5 мин и переносят супернатант в чистую пробирку^{а)}.
3. Концентрируют образец вакуумным центрифугированием или лиофилизацией, уменьшив первоначальный объем на 75 %. Кроме того, можно сконцентрировать образец, выдувая избыток этанол/дистиллированная H_2O потоком сжатого воздуха при температуре образца 60 °C.
4. Наносят 10—15 мкл экстракта на электрофореграмму, как описано в разд. 6.10.
5. Проводят электрофорез, как описано в разд. 6.10, и высушивают в потоке холодного воздуха.
6. Погружают электрофореграмму (начиная с отрицательного полюса) в 100 мл реагента А^{б)} и затем быстро высушивают.
7. Когда электрофореграмма высохнет, погружают ее в 100 мл реагента Б^{б)} и высушивают.
8. Фиксируют окрасившиеся пятна, погружая электрофореграмму в реагент С^{б)} или готовый фотофиксаж.
9. Промывают в течение 30 мин под струей водопроводной воды и затем высушивают.
10. О наличии агропина или маннопина (в зависимости от штамма *A. rhizogenes*, используемого при трансформации) судят по темно-коричневым или черным пятнам на расстоянии 5—8 см от старта.

Примечания

- ^{а)} В некоторых экстрактах, особенно полученных из опухолей косматых корней, агропин можно определять, не концентрируя экстракт.
- ^{б)} 1) Готовят насыщенный раствор $AgNO_3$ (2,5 г/мл). Добавляют по каплям 0,5 мл насыщенного $AgNO_3$ к 100 мл ацетона, размешивая до исчезновения всего осадка. Реактив можно повторно использовать для 5—10 определений.
- 2) Добавляют 10 мл 20%-ного (вес на объем) $NaOH$ к 90 мл метанола. Используют немедленно.
- 3) Растворяют 5 г тиосульфата натрия ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) в 100 мл H_2O .

Литература

1. Apel K., Kloppstech K. (1978) The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of light-harvesting chlorophyll a/b protein. Eur. J. Biochem. 44, 581—8.
2. Berk A. J., Sharp P. A. (1977) Sizing and mapping early adenovirus mRNAs

- by gel electrophoresis of *SI* endonuclease-digested hybrids. *Cell* **12**, 721—32.
3. Bevan M. W. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8711—21.
4. Bevan M. W., Flavell R., Chilton M.-D. (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for higher plant transformation. *Nature* **304**, 184—7.
5. Bolivar F. (1978) Construction and characterisation of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* sites for selection for selection of *EcoRI* generated recombinant DNA molecules. *Gene* **4**, 121—36.
6. Boulnois G. (1987) *Gene Cloning and Analysis: a laboratory guide*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
7. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248—54.
8. Burnette W. N. (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195—203.
9. Broglie R., Coruzzi G., Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Niedermeyer J. G., Fink C. L., Flick J. S. (1984) Light regulated expression of a pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit in transformed plant cells. *Science* **224**, 834—8.
10. De Block M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J.* **3**, 1681—9.
11. De Greve H., Dhaese P., Seurinck J., Lemmers M., Van Montagu M., Schell J. (1983) Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid-encoded octopin synthase gene. *J. Mol. Applied Genet.* **1**, 499—513.
12. Dunsmuir P. (1985) The petunia chlorophyll a/b binding protein genes: a comparison of *Cab* genes from different gene families. *Nucl. Acids Res.* **13**, 2503—18.
13. Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Sanders P. R., Flick J. S., Adams S., Bittner M., Brand L., Fink C. L., Fry J., Galluppi G., Goldberg S., Hoffman N. L., Woo S. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4803—7.
14. Fromm M., Taylor L. P., Walbot V. (1985) Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5824—8.
15. Goldman P. R., Northrop D. B. (1976) Purification and spectrophotometric assay of neomycin phosphotransferase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 1408—13.
16. Gorman C. (1985) High efficiency gene transfer into mammalian cells. In: *DNA Cloning*, Vol. II, pp. 143—190. Ed. Glover D. M., IRL Press Oxford.
17. Gorman C., Moffet L., Howard B. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044—51.
18. Grierson D., Covey S. (1984) *Plant Molecular Biology*. Blackie, Glasgow.
19. Guilbault G. (1973) *Practical Fluorescence: Theory, Methods and Techniques*. Dekker, New York.
20. Hames B. D. (1981) In: *Gel electrophoresis of protein. A Practical Approach*. Eds. Hames, B. D. and Rickwood, D. IRL Press, Oxford.
21. Helmer G., Casadaban M., Bevan M., Kayes L., Chilton M.-D. (1984) A new chimeric gene as a marker for plant transformation: The expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in sunflower and tobacco cells. *Biotechnology* **2**, 520—7.

22. Hepburn A. G., Clarke L. E., Pearson L., White J. (1983) The role of cytosine methylation in the control of nopaline synthase gene expression in a plant tumor. *J. Mol. Applied Genet.* 2, 315—29.
23. Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M., Schell J. (1983b) Chimaeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2, 987—95.
24. Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. (1983a) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209—13.
25. Herrera-Estrella L., Van den Broeck G., Maenhaut R., Van Montagu M., Schell J., Timko M., Cashmore A. (1984) Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti-plasmid vector. *Nature* 310, 115—20.
26. Jefferson R. A., Burgess S. M., Hirsch D. (1986) β -Glucuronidase from *E. coli* as a gene fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8447—51.
27. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3301—7.
28. Jones J. D. G., Dunsmuir P., Bedbrook J. (1985) High level expression of introduced genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.* 4, 2411—18.
29. Jones A. M., Vierstra R. D., Daniels S. M., Quail P. (1985) The role of separate molecular domains in the structure of phytochrome from etiolated *Avena sativa*. *Planta* 164, 501—6.
30. Kovacs B. J., Butterworth P. H. W. (1986) The effect of changing the distance between the TATA-box and CAP site by up to three base pairs on the selection of the transcriptional start of a cloned eukariotic gene *in vitro* and *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 14, 2429—42.
31. Kozak M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukariotic ribosomes. *Cell* 44, 283—92.
32. Labarca C., Paigen K. (1980) A rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344—52.
33. Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., Boedtker H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743—51.
34. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
35. Matsushashi Y., Sawa T., Takeuchi T., Umezawa H. (1976) Purification of aminoglycoside 3-phosphotransferase II. *J. Antibiotics* 29, 204—7.
36. Morelli G., Nagy F., Fraley R. T., Rogers S. G., Chua N.-H. (1985) A short conserved sequence is involved in the light-inducibility of a gene encoding ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea. *Nature* 315, 200—4.
37. Murai N., Sutton D. W., Murray M. G., Slightom J. L., Merlo D. J., Reichert N. A., Sengupta-Gopalan C., Stock C. A., Barker R. F., Kemp J. D., Hall T. D. (1983) Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222, 476—82.
38. Murray M. G., Thompson W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8, 4321—5.
39. Nagy F., Kay S. A., Boutry M., Hsu M.-Y., Chua N.-H. (1986) Phytochrome controlled expression of a wheat Cab gene in transgenic tobacco seedlings. *EMBO J.* 5, 1119—24.
40. Novel G., Novel M. (1973) Mutants of *E. coli* K12 unable to grow on methyl- β -D-glucuronide: Map location of *uidA* locus of the structural gene of β -D-glucuronidase. *Mol. Gen. Genet.* 120, 319—35.
41. O'Brien T. P., McCully M. E. (1981) *The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods*. Termarcaphi Pty. Ltd., Melbourne.

42. *Ow D. W., Wood K. V., Deluca M., De Wet J. R., Helinski D. R., Howell S. H.* (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**, 856—9.
43. *Pearse A. G. E.* (1972) *Histochemistry: Theory and Applied*. 3rd edn., Vol. II, pp. 808—40. Churchill Livingstone Press, Edinburgh.
44. *Potrykus I., Paszkowski J., Saul M. W., Petruska J., Shillito R.* (1985) Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 169—77.
45. *Pelham H. R. B., Jackson R. J.* (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247—56.
46. *Reiss B., Sprengel R., Will H., Schaller H.* (1984) A new sensitive method for quantitative and qualitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts. *Gene* **30**, 211—18.
47. *Richards G. M.* (1974) Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal. Biochem.* **57**, 369—76.
48. *Sanders P. R., Winter J. A., Barnason A. R., Rogers S. G., Fraley R. T.* (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1543—61.
49. *Schreier P. H., Seftor E. A., Schell J., Bohnert H. J.* (1985) The use of nuclear encoded sequences to direct the light regulated synthesis and transport of a foreign gene protein into plant chloroplasts. *EMBO J.* **4**, 232—55.
50. *Scott R. J., Draper J.* (1987) Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells: A useful model system for gene expression studies in plants. *Plant Mol. Biol.* **8**, 265—74.
51. *Shaw C. H., Sanders D. M., Bates M. R., Shaw C. H.* (1986) Light regulation of a SSRubisco-nos chimaeric gene: photoregulatory control sequences from a C₃ plant functions in cells of a CAM plant. *Nucl. Acids Res.* **14**, 6603—13.
52. *Stockhaus J., Eckes P., Blau A., Schell J., Willmitzer L.* (1987) Organ-specific and dose-dependent expression of a leaf/stem specific gene from potato after tagging and transfer into potato and tobacco plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 3479—90.
53. *Thomashow M. F., Nutter R., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W.* (1980) Integration and organisation of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* **19**, 729—39.
54. *Van den Broeck G., Timko M. P., Kausch A. P., Cashmore A. R., Herrera-Estrella L.* (1985) Targeting of a foreign protein to chloroplasts by a fusion to transit peptide of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Nature* **313**, 358—63.
55. *Ward M., Scott R. J., Davey M. R., Clothier R. H., Cocking E. C., Balls M.* (1986) Transfer of antibiotic resistance genes between yeast and mammalian cells under conditions favouring cell fusion. *Somatic Cell. Mol. Genet.* **12**, 101—9.
56. *Weaver R. F., Weissman C.* (1979) Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: the 5' termini of 15S β -globin mRNA precursor and mature 10S β -globin mRNA have identical map coordinates. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1175—93.
57. *Zambryski P., Joos H., Gentello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J.* (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* **2**, 2143—50.

Список фирм — поставщиков реактивов и оборудования

Addis Ltd.,
Ware road,
Hertfordshire SG13 7HL.

Amersham International PLC,
White Lion Road,
Amersham,
Buckinghamshire HP7 9LL.

Anachem Ltd.,
20 Charles Street,
Luton,
Bedfordshire UL2 OEB.

John Bass Ltd.,
Bassaire Building,
Duncan Road,
Swanwick,
Southampton SO3 7ZS.

BCL,
Boehringer Mannheim House,
Bell Lane,
Lewes,
East Sussex BN7 1LG.

BDH Ltd.,
Broom Road Parkstone,
Poole,
Dorset BH12 4NN.

Beatson, Clark & Co. Ltd.,
23 Moorgate Road,
Rotherham,
South Yorkshire S60 2AA.

Beckman—RIIC Ltd.,
Progress Road Sands Industri-
al Estate,
High Wycombe,
Buckinghamshire HP12 4JL.

BRL (UK) Ltd.,
P. O. Box 35,
Trident House,
Renfrew Road,
Paisley,
Scotland PA3 LEF.

Cadbury Typhoo Ltd.,
P.O. Box 171,
Bournville,
Birmingham B30 2NA.

Calbiochem,
Cambridge Bioscience,
42 Devonshire road,
Cambridge CB1 2BL.

Ciba-Geigy
Pharmaceutical Division,
Wimblehurst Road,
Horsham,
West Sussex RH12 4AB.

Corning Medical,
Corning Ltd.,
Halstead,
Essex CO9 2DX.

Decon Laboratories Ltd.,
Conway Street,

Hove,
Sussex BN3 3LY.

Difco Laboratories Ltd.,
P.O. Box 14B,
Central Avenue,
East Moseley,
Surrey KT8 OSE.

Dow Chemical Company Ltd.,
Meadowbank,,
Bath Road,
Hounslow,
Middlesex TW5 9QV.

Du-Pont (UK) Ltd.,
Instrument Products,
Wedgewood Way,
Stevenage,
Hertfordshire SG1 4QN.

Fisons Ltd.,
Fisons House,
9 Grosvenor Street,
London W1X OAH.

Flow Laboratories Ltd.,
Woodcock Hill,
Harefield Hill,
Rickmansworth,
Hertfordshire CM23 3DH.

Gallenkamp,
P.O. Box 290,
Technico House,
6 Christopher Street,
London EC2P 2ER.

Jencons (Scientific) Ltd.,
Cherrycourt Way Industrial Es-
tate,
Stanbridge Road,
Leighton Buzzard,
Bedfordshire LU7 8UA.

Koch-Light Ltd.,

37 Hollands Road,
Haverhill,
Suffolk CB9 8PU.

Kodak (Photographic) Ltd.,
Kodak House,
Station Road,
Hemel Hempstead,
Hertfordshire.

Krüss Wissenschaftliche Labor-
gerate,
Krüss GmbH,
Borsteler Ch. 85-99a,
D-2000 Hamburg 61,
West Germany.

E. Leitz (Instruments) Ltd.,
48 Park Street,
Luton,
Bedfordshire LU1 3HP.

Lever Brothers Ltd.,
Lever House,
3 St. James Road,
Kingston-upon-Thames,
Surrey KT11 2BA.

LKB Instruments Ltd.,
232 Addington Road,
Selsdon,
South Croydon,
Surrey CR2 8YD.

3M United Kingdom PLC (UK),
Scientific Marketing Associates
(agent),
37 Mildmay Green,
London N1 4RH.

Metal Box PLC,
Queen House,
Forbury Road,
Reading,
Berkshire RG1 3JH.

Millipore (UK) Ltd.,
11-15 Peterborough Road,
Harrow,
Middlesex HA1 2YH.

Mini Instruments Ltd., 8 Station Industrial Estate,
Burnham-on-Crouch,
Essex CMO 8RN.

Monoject Division,
Sherwood Medical Industries Ltd.,
London Road County Oak,
Crawley,
West Sussex RH10 2TL.

MSE Scientific Instruments Ltd.,
Manor Royal,
Crawley,
West Sussex RH10 2QQ.

Nalgene Labware (US)
Nelson Scientific Ltd. (agent),
13 Stanley Road,
Whitefield,
Manchester M25 6GT.

Narishige Scientific Instruments Laboratories,
Optical Instrument Services (Croydon)
Ltd. (agent),
166 Anerley Road,
London SE20 8BD.

New England Biolabs (US),
CP Laboratories (agent),
P.O. Box 22,
Bishops Stortford,
Hertfordshire CM23 3DH.

Nikon (UK) Ltd.,
Haybrook,
Halesfield 9,
Telford,

Shropshire TF7 4EW.

Oxoid Ltd.,
Kingsland Industrial Estate,
Wade Road,
Basingstoke,
Hampshire RG24 0PW.

William Pearson Ltd.,
Clough Road,
Hull HU6 7QA.

Perkin-Elmer Ltd.,
Post Office Lane
Beaconsfield,
Buckinghamshire HP9 1QA.

Pharmacia Ltd.,
Pharmacia House,
Midsummer Boulevard,
Central Milton Keynes,
Buckinghamshire MK9 3HP.

Polaroid (UK) Ltd.,
Ashley Road,
St. Albans,
Hertfordshire AL1 5PR.

Robinson and Sons Ltd.,
Wheat Bridge Mills,
Chesterfield.

Rousell Laboratories Ltd.,
Broadwater Park,
North Orbital Road,
Uxbridge,
Middlesex UB9 5HP.

W. Sarstedt & Co.,
68 Boston Road,
Beaumont Leys,
Leicester LE4 1AW.

Sigma Chemical Company Ltd.,
Fancy Road,
Poole,

Dorset BH17 7NH.

Slee Medical Equipment Ltd.,
Lanier Works,
Hither Green Lane,
London SE13 6QD.

H. Smith Plastics Ltd.,
The Mayphil Industrial Area,
Battlesbridge,
Wickford,
Essex SS11 7RJ.

Sterilin Ltd.,
Sterilin House,
Midsummer Boulevard,
Milton Keynes MK9 3HP.

Stewart Plastics Ltd.,
Purley Way,
Croydon CR9 4HS.

Supa Aquatic Supplies Ltd.,
Unit I,
Hartington Industrial Estate,
Staveley,
Chesterfield,

Derbyshire.

Suttons Seeds Ltd.,
Hele Road,
Torquay,
Devon TQ2 7QJ.

Thorn-EMI Instruments Ltd.,
Archcliffe Road,
Dover,
Kent CT17 9EN.

R.W. Unwin Ltd.,
Prospect Place,
Welwyn Garden City,
Hertfordshire.

UV Products Ltd.,
Science Park,
Milton Road,
Cambridge CB4 4BN.

Whatman Laboratory Sales
Ltd.,
Springfield Mill,
Maidstone,
Kent ME14 2LE.

Предметный указатель

Агарозный гель, электрофорез 51—53, 71—72, 280—286

Агропин 11, 13, 14, 34, 99, 386—387

Агроцинопин 11, 13

Амариллисы 11

Антибиотики, введение в среду для роста растений 175, 176, 181

— **использование для отбора** 18, 82, 96—98, 109, 117, 197, 199

Ауксины 11, 13, 14, 32, 89—91, 96, 160

Ацетосирингон, активация *Agrobacterium* 15—17, 91, 95

Бактериальные штаммы, длительное хранение 14

— **рост** 39—42

— **селективная среда** 82

Бинарные векторы см. Транс-векторы

Блеомицин, ген устойчивости (BLE) 33, 98

Векторы «маркирования» генов 29

Вестерн-блоттинг, определение NPT-II 357—362

Висячая капля, культура 225, 231

Витрификация 105

BMIC, промотор гена 35S (см. CaMV)

Внутренние фрагменты T-ДНК 314

β -Галактозидаза 26, 34, 36, 42, 62, 97, 99

— **трансформация *E. coli*** 62

Гены, слияние 362—376

Гербициды, устойчивость 34, 96

Гетерогенная ядерная РНК (гЯРНК) 305—306

Гибридизация 78—80

— **ДНК на фильтре по Саузерну** 293—297

— **пробы, метод меченния с использованием в качестве затравки олигонуклеотидов** 297—301

Гигромицин 33, 98, 176, 188

Гигромицинофототрансфераза 98

Гипокотиль, трансформация 135—140

β -Глюкуронидаза см. GUS

— **активность, определение** 366—371

— **выделение из тканей растений** 366—368

— **гистохимическая локализация** 374—376

— **локализация in situ** 371—374

— **слияние генов** 364—366

Глифосат 33, 98

Горох см. *Pisum sativum*

Двудольные 11, 87, 199

Дефосфорилирование 50—51, 56

Дигидрофолатредуктаза 98

Дифениламин, реагент для количественного определения ДНК 262—264

ДНК, введение в клетку 196—197

— **посредством липосом** 197

— **с помощью полиэтиленгликоля** 203—206

ДНК, выделение 236—238

— **в градиенте CsCl/БЭ** 274—276

— **загрязнения** 236—238

— **из лиофилизированного материала** 236, 239—248

— **из митохондрий** 258—262

— **из свежего материала** 248—254

— **из хлоропластов** 258—262

— **из ядер** 250—264

— **протопластов** 263—264

— **метод с использованием ДСН** 249—253

— **с протеиназой К** 245—248, 252—253

— **метод с использованием СТАВ-буфера** 241—245

— **из лиофилизированного материала** 273—274

— **из свежего материала** 249

ДНК, перенос генов (DMGT) 311, 317

— **векторы** 199—201

— **в интактную ткань растений** 201—203

— **в протопласты** 196—199

ДНК, рестрикционные фрагменты

— **внешний вид образца** 248

— **дефосфорилирование** 50—51

— **лигирование** 54—61

— **типы, подходящие для лигирования** 311—324

ДСН, выделение ДНК 249—254

Изолированная ДНК вектора

— **трансформация протопластов** 196—197

Изолированная ДНК плазмид, формы 43—44

Идинокаторные гены 20—33, 29, 101, 216, 308—311

— **и анализ регуляторных последовательностей генов** 308—311

— **CAI** 331—340

— **GUS** 362—376

— **NPT-II** 340—343

Инсерционное число, T-ДНК 315

Интактная ткань растений, трансформация векторами DMGT 201—203

Интронов последовательности 305—306

Кабоше, среда 173—174

Каллус, фаза, регенерация трансформированных растений 105

— **льна** 130—140

— **табака** 159—160

Канамцин, устойчивость 26, 33, 62, 74, 96, 120, 175

— **сконструированный ген *nos-npt-II*** 317—318

Картофель см. *Solanum tuberosum*

Клетки, компетентные для трансформации 95—96

Клетки, разбухание 103, 105

Клонирование, стратегия 34—37

— **сайты** 20—23, 27—29, 34—35

Коинтеграционные векторы см. Цис-векторы

Коинъюгация плазмид *Agrobacterium* 72—76

Копийность T-ДНК 311

Корнеобразующая плаزمида см. Ri-плазмиды

Корончатые галлы 11, 17, 87—88

Косматые корни 11, 14, 88

Космидные векторы 29

Кукуруза см. *Zea mays*

Культура, рост бактерий 39—42

Культуральная среда для растений 171—175

Леч см. *Linum usitatissimum*

Лигирование 54—61

Лилейные 11

Леофилизированная ткань растений 239—248

Липкие концы, лигирование 60—61

Листовые диски, трансформация 119—130

- Липосомы, введение ДНК 196—197, 198
Литий хлористый, метод выделения РНК 269—270
Люцифераза 34, 97
- Макроинфекции 202—203
Маннопин 14, 34, 336
Маркерные гены
— селективные 21, 23, 33, 96—99
— скринируемые 33—34, 96—97, 100—101
Микроинфекции 201—202, 221—232
Микрокапель, культура 225, 231
Митохондриальная ДНК, выделение 258, 262
Морковь (см. *Daucus carota*)
мРНК 13
— разделение 270—273
— строение 305—306
Мурашье и Скуга, среда 171—173
- Неомицинофосфотрансфераза II (NPT-II) 25, 98, 309, 385—386
— в качестве индикаторного гена 22—23, 309, 340—343
— определение в вестерн-блоттинге 357—362
— определение *in situ* 352—357
Неопухолеродные векторы 18—26, 76, 96, 101, 109, 115—119
Нозери-блоттинг 238, 271, 307, 324—331, 383—385
Нопалин 11—14, 17, 21, 23, 34, 99, 309, 378
— определение в трансформированных тканях 377—382
— промотор в транс-векторах 24
Нуклеиновая кислота, выделение из *Agrobacterium* 76—78
Нуклеиновая кислота, введение в протопласты 196—197
- Однодолные 11, 87, 199
Октопин 11—14, 17, 21, 34, 99, 309
Олигонуклеотиды, использование в качестве затравки при мечении 297—301
Опины 11—14, 377
Опухолеродные векторы *Agrobacterium* 13, 88—91, 95—96, 102—103
— дикого типа 105—117
— удаление генов 18, 22
Органогенез 26, 95, 105, 182—184, 187
- Перестроенные фрагменты Т-ДНК 315
Плазмидные (космидные) векторы, спасение 29
Побегн, отсутствие 127
Пограничные фрагменты Т-ДНК 314
Полисахариды 32, 237
Полифенолы 103, 105
Полиэтиленгликоль 198, 203—212
Протеиназа К, использование для выделения ДНК 252—254
Протенназый метод выделения ДНК 245—248
Поли(А)+ мРНК, получение 239, 270—273
Полиакриламидный гель, электрофорез 347—352
— GUS, локализация *in situ* 371—374
— NPT-II, определение 347—352
Протопласты
— введение ДНК 196—197
— стимуляция ПЭГ 203—212
— иммобилизация 223—225, 228—229
— получение каллуса 108
- табака 143—151
— трансформация
— путем введения генов посредством ДНК 196—197, 199
— путем совместного культивирования 151—160
— путем электропорации 212—221
— ядерная ДНК, выделение 257—258
- Разоруженные векторы *Agrobacterium* 96
Рана, взаимодействие с *Agrobacterium* 91—95, 107—108
Растительные гены, организация 304—306
РБФК/О 235, 306, 308
— в этилированном горохе 235—236
— последовательность транзитного пептида 341—343
Рекомбинантная ДНК, методы 195—196
Реконструкция ДНК, блоттинг по Саузерну 319—320
Рестриктазы 43, 49—50, 80, 277—280, 319—320
— буферы 278, 301
— сайты клонирования 21, 23, 34—35
Рестриктазы, обработка 47, 68—69, 71—72, 78—80, 277—280, 321—322
Рифампицин, устойчивость 23, 26, 74, 82
РНК, выделение 238—239, 265—270
— мРНК, фракционирование 270—273
Рожь (см. *Secale*)
- Саузерна блоттинг 78—80, 236, 287—292, 311—324
— гибридизация 293—297
— общая схема 289—290
Селективные маркерные гены 21, 23, 33, 96—99
Скрининг, использование маркерных генов 34, 96—101
Совместное культивирование, методы 137, 141—143
— *Agrobacterium*, трансформация протопластов 151—160
Составные фрагменты Т-ДНК 314
- Табак (см. *Nicotiana tabacum*)
Т-ДНК
— *Agrobacterium* 11—14
— вектор, ограничения 194—195
— границы 13—15, 20—22, 24
— онкогены 14, 17, 88—90
— перенос, механизм 15—17
— рестрикции, типы фрагментов 313—317
— трансмиссия, усилители 32
Тканеспецифическая экспрессия гена 339—340
Ткань, среда для культивирования 171—176
Томат (см. *Lycopersicon*)
Тотальная ДНК растений
— выделение 239—258, 273—274
— из лиофилизированных тканей 239—248
— из свежих растений 248—257
— рестрикция *Agrobacterium* 78—80
Тотальная РНК растений, выделение 238—239, 265—270
Тотальный препарат нуклеиновых кислот, выделение из *Agrobacterium* 76—78
Транзитный пептид, последовательности 305, 307
— изучение с помощью NPT-II 340—343
Траис-векторы 19, 22—27, 76, 78, 102, 104, 195

— конъюгация и стабильность 30—31
 — на основе *A. rhizogenes* 27
 Транс-зеатин, локус 32—33, 102, 185
 Транскрипция in vitro (run-off transcription) 254, 258
 Трехродительское скрещивание 72, 74, 195
 Тупые концы, лигирование 61

Щегил триэтиламмоний бромид см. СТАВ-буфер

Цис-векторы 20—23, 26—27, 73, 78, 195
 — для переноса генов посредством ДНК 200
 — конъюгация и стабильность 30—31
 — на основе *A. rhizogenes* 26—27
 — характеристика 76
 Цитокинины 11, 14, 32—33, 89, 90, 102, 109, 129

Фенольный метод выделения РНК 238—239, 265—269

Фидерные культуры (кормящие культуры) 161, 166, 225, 231—232

Фитогормоны, образование *Agrobacterium* 14, 32, 33

— синтез в опухолях 90, 96
 Фитохромы, контроль транскрипции Cab 326—331

— экспрессия Cab-cat 336—340
 Флуоресцентное окрашивание, развитие протопластов 180

Хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT) 98, 199—200, 308—310, 331—340, 385—386

— определение 331—336
 — Cab-cat экспрессия 340—343
 — — органоспецифичность 339—340
 — — на свету и в темноте 337—339
 — — фитохромный контроль 338—339
 — и электропорация 215—216

Хлоропласты

— выделение ДНК 258—262

— интактные табака 343—346

Хлорофилл a/b связывающий белок (Cab) 306—307

— контроль экспрессии гена cat 337—340

— транскрипционный контроль, осуществляемый фитохромом 326—331

Хлорофилла распад 103

Хогланда раствор 132, 175

Хромосомный фон *Agrobacterium* 32

Эксплантаты

— методы совместного культивирования 140—143

— рост в культуре 92, 94—95

Экспрессии векторы 27—29

Электропорация 198, 212—221

— активность CAT 217

— временная экспрессия 215—216

— протопластов растений 214—215

— стабильная трансформация 216

Эмбриогенез 26, 95, 105, 160, 169, 184

Эндоцитоз 404

Ядерная ДНК, выделение 254—257

— из протопластов 201—208

Ячмень см. *Hordeum*

Указатель латинских названий

Agrobacterium

- вектор pGV3850, рестрикционная карта 318
- векторная система, выбор 29—35
- векторы, методы трансформации 103—105
- дикий тип, онкогенные штаммы 103—117
- культуры, рост 40
- неонкогенные векторы 18—27, 76, 96, 101, 109, 115, 117—119
- онкогенные векторы 13, 87—91, 102—103
- определение GUS 367
- трансформация путем совместного культивирования 151—160
- хромосомный фон 32
- Agrobacterium rhizogenes* 110—111, 113
- Ti-плазмида 11, 14—15, 18, 26—27, 32, 34, 88, 91, 95, 102, 109
- векторы, используемые для трансформации 26—27
- Agrobacterium tumefaciens* 236
- Ti-плазмида 11, 13, 16, 88—91, 95
- тотальной нуклеиновой кислоты, выделение 76—78
- Arabidopsis thaliana* 188—189, 364

B5 среда 174

Beta vulgaris 110, 113

Brassica napus 110, 187—188, 364

СААТ-бокс 305—306, 308, 327

Сав см. хлорофилл а/б связывающий белок

СаMV 28, 57, 98—100, 200, 216, 337, 365

САР-сайт 304—305

САТ см. хлорамфениколацетилтрансфераза

ColEI репликоны 73

Convolvulus arvensis 184

СТАВ-буфер, использование для выделения ДНК 239—245

— из большого количества ткани 273—274

Cuscuta sativus 187

— косматые корни 27

Daucus carota 113, 184—185

— клетки суспензии 160—170

— NPT-II, экспрессия 257—262

— трансформация *Agrobacterium* 110, 114

T-ДНК, изучение организации 317—324

Escherichia coli 40

— β-глюкуронидазы ген 364

— клонирующие векторы, конъюгация *Agrobacterium* 20—21, 24, 30—37

— плазмиды, выделение

— минипрепараты 67—71

— — в большом объеме 42—48

Gossypium hirsutum 189

GUS см. β-глюкуронидаза

Hordeum 306, 364

Linum usitatissimum 130—140, 189

Lotus corniculatus 187

Lycopersicon esculentum 27, 182—183, 364

Medicago sativa 186

Medicago varia 185

Nicotiana tabacum 87, 97, 105, 120, 182, 308, 364

— Cab-cat, трансформация 336—340

— интактные хлоропласты, выделение 343—346

— листовые диски, трансформация 119—130, 182

— мезофилл, протопласты 143—151, 178—179

— МС РБФК/О, трансформация 342

— размножение 127—129

— регенерация из каллуса 159—160

— совместное культивирование с *Agrobacterium* 151—160

— ядерная ДНК, выделение 254—257

NPT-II см. Неомизинфосфотрансфераза II

Petunia 97, 105, 111, 120, 182, 195, 203, 308, 326, 364

Pisum sativum 110, 326—331

Populus 33, 185

Rhozyme 367

Ri-плазмида (вызывающая рост корней от англ. root inducing) 11, 14—15, 18, 26—27, 32, 34, 88, 91, 95, 102, 104, 106, 109

— маркеры в трансформированных клетках 34

— супервирулентная 32

RK2-репликон 19, 73—74

Secale 202

Solanum tuberosum 110—111, 121, 184, 364

Staphylococcus aureus 358

ТАТА-бокс 305, 308—309, 327, 343

Ti-плазмида (вызывающая опухоль плазмиды, от англ. tumor inducing) 11—14, 16, 88—91, 95

— векторная система, выбор 29—35

— неопухолеродные векторы 18—26

— основные компоненты 18

— рана, взаимодействие 91—95

— супервирулентная 32

Trifolium repens 187

Указатель латинских названий

Vir (virulence) вирулентность

— гены, перенос Т-ДНК 12—17, 18—20, 22—

117, 182—189

— область 12—14, 24—27, 33

— — и клетки однодольных 194

— плазмиды-помощники 20, 57, 101—102,

Zea mays 306

Указатель методик

Агропния, определение 386

Антибиотики 82

— добавление в среду для выращивания бактерий 171, 181—189

— отбор бактерий 82, 96

Бактерии, выращивание и поддержание культуры 39

— длительное хранение 41

— посев для получения отдельных колоний 39—40

— ночные культуры 40

— чашки для отбора бактерий 41—42

— штаммы бактерий 82

Белок, определение концентрации по Брэдфорду 386

Вестерн-блоттинг 357

Высадка культивируемых проростков в землю 129

β-глюкуронидаза (GUS), определение 362

— анализ *in situ* в ПААГ 371—374

— в протопластах растений 367

— в тканях, трансформированных *Agrobacterium* 367

— гистохимическая локализация 374—376

— путем выделения из тканей растений 366

— флуориметрия 368

β-Глюкуронидаза (GUS), слияние генов 364

Дифениламинная реакция для определения концентрации ДНК 262

ДНК, выделение 236

— из лиофилизированной ткани 239

— из протопластов 206, 257

— из свежей ткани 249

— из хлоропластов из митохондрий 258—262

— из ядер 254

— метод с использованием СТАВ-буфера 206—208, 239—245, 273—274

— общие положения 236

— протенназый метод 245

— протенназый метод с использованием ДСН 252—254

ДНК/РНК гибридализация 277

— блоттинг по Саузерну 79—80, 287, 311, 317—324

— Нозерн-блоттинг 383—385

— Нозерн-блоттинг точечный 324, 328—331

— Т-ДНК, копийность 319—320, 322—324

— Т-ДНК, структура 319—320, 323

— точечный блоттинг ДНК 208

ДНК, лигирование 54

— лигирование с векторами для трансформации растений 35—37, 59

— определение условий для лигирования 54—59

ДНК, определение концентрации с помощью дифениламина 262—264

Жизнеспособность клеток, определение с помощью флуоресцеиндиацетата 180—181

Индикаторный ген, определение 308

— CAT 331, 334—340

— GUS 362, 366

— NPT-II 352, 354—357

Клеточная стенка и клеточная пластинка, визуализация с помощью тинопала 150—151, 153, 180

Конъюгативное введение плазмид в *Agrobacterium* 22—26, 29—30, 72

Культивирование совместно клеток растений и агробактерий 151, 153—159, 161

Микроинъекции 221

— иммобилизованных клеток, метод 223—226

— культура микроинъектированных клеток 225, 230—231

— микропипетки, приготовление и заполнение 227

Митохондрии, выделение 258, 260—262

Молекулярно-биологическое оборудование 60—82

Неомифинфосфотрансфераза II (NPT-II), выделение 385—386

Неомифинфосфотрансфераза II (NPT-II), определение 340—343, 346—347, 352—362

Нозерн-блоттинг, анализ транскриптов 383

Нопалин, определение 377, 379—382

Отбор трансформированных тканей 95, 114—115

— клеток суспензионной культуры 168—170

— колоний, полученных из протопластов 156—159

— побегов листовых дисков 122—125

— побегов, полученных из каллуса 136—140

Плазмиды, выделение 42

— в больших объемах из *E. coli* 42, 46—48

— минипрепаратов из *E. coli* 67—71

Побеги, регенерация 89—95, 103—105, 118

— лен, трансформированный каллус 134—140

— лен, эксплантаты проростков 132

— табак, каллус 159

— табак, листовые диски 119, 122—125

Полиакриламид, электрофорез в геле (ПААГ) 347

— Вестерн-блоттинг 347—348, 361—362

— неденатурирующий 347—348

— определение GUS 371—374

— определение NPT-II 347—352

Полусухой блоттинг 361—362

Протопластов культура 149

— протопласты, раннее развитие и деление 149—151

— протопласты, среда для культивирования 178—179

Протопласты, получение 143, 178

— из клеток мезофилла листа (табак) 143, 146—148

— из клеток суспензионных культур *Petunia* 232

— ферменты и растворы для промывания, используемые для получения протопластов 178—179

Протопласты, трансформация методом 140—141, 196—199

— микроинъекций 201, 221—226, 227—232

- с использованием ПЭГ 203, 205—206, 208—212
- совместного культивирования с *Agrobacterium* 141—143, 151, 153—159
- электропорации 212—221

Радиоактивное мечение ДНК 297

- измерение включения радиоактивной метки 302—303
- концов маркеров для определения молекулярной массы 302
- методом синтеза с использованием в качестве затравки олигонуклеотидов 297, 299—301

Размножение трансформированных побегов 127

- пазушными почками 127—129
- растения, среда для культивирования 171
- Рестриктазы, обработка ДНК 277
- плазмидной ДНК *E. coli* 71
- растения, геномная ДНК 321
- тотальной ДНК *Agrobacterium* 78

Рестрикционные фрагменты, очистка и дефосфорилирование 49

- дефосфорилирование 50
- фенольная экстракция 50
- центрифугирование 53
- электроолюция 51
- РНК, выделение 233
- лигил хлористый 269—270
- общие положения 265
- поли(А)+ мРНК 270—273
- фенольный метод 265—269

Саузерн блоттинг

- *Agrobacterium*, тотальная ДНК 80
- растения, геномная ДНК 311, 317—324
- Т-ДНК, копияность 319—320, 322—324
- Т-ДНК, общий анализ 312
- Т-ДНК, структура 319—320, 323
- Стерильные проростки 132—133
- получение 132—133
- приготовление эксплантата 182

Т-ДНК, анализ 312

- Тканей культура, материалы 170
- Трансформация *E. coli* 61—62
- получение компетентных клеток 64—65
- трансформация компетентных клеток 65—67
- Трансформация клеток растений с использованием штаммов *Agrobacterium*, не вызывающих опухоли 104, 106—107, 117
- большие гетерогенные эксплантаты 106—107, 117
- клетки, полученные из протопластов табака 151, 153—156
- клетки суспензионной культуры моркови 160—165
- листовые диски табака 119, 122—125

- эксплантаты проростков (гипокотильная) 135—140

Трансформация клеток растений с использованием штаммов *Agrobacterium*, вызывающих образование опухоли 104—117

Укоренение трансформированных побегов 125—127, 138—140

Фидерные (кормящие) культуры 161, 166, 223, 231—232

Фиколл, ступенчатый градиент для очистки хлоропластов 345

Флуоресценция, методы окрашивания 180—181

- жизнеспособность клеток, определение методом окрашивания диацетатом флуоресценна 180—181
- клеточной стенки и клеточной пластинки, визуализация с использованием тинопада 180
- ядер, подсчет при окрашивании акридиновым оранжевым 180

Хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT)

- выделение 385—386
- определение 331—336, 340—341
- Хлористый цезий бромистый этидий, центрифугирование в градиенте плотности
- выделение плазмид 46—48
- очистка ДНК растений 274
- Хлоропласты, выделение 258—262, 343—346

Эксплантаты, приготовление 181

- Электрофорез в агарозном геле 280
- блоттинг по Саузерну тотальной ДНК *Agrobacterium* 79
- блоттинг по Саузерну геномной ДНК растений 311, 317—324
- гель с формальдегидом для юзерн-блоттинга 383—384
- маркеры для определения молекулярной массы 280—286, 320, 322
- разрешение 281, 286
- рестрикционный анализ 71—72
- Эмбрионные суспензионные культуры клеток
- индукция эмбриогенеза 160, 169—170
- получение суспензионных культур 165—166

Ядра, визуализация с помощью акридинового оранжевого 180

- Ядра, выделение 254
- из протопластов 257—258
- из свежих листьев и ткани каллуса 254—257

Оглавление

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	6
Список авторов	8
Список сокращений	9
Глава 1. Агробактериальные трансформирующие векторы растений. Ф. Армитидж, Р. Уолден, Дж. Дрейпер	11
1.1. Введение	11
1.1.1. Индукция опухолей агробактерий	11
1.1.2. Ti-плазмиды <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
1.1.3. Ri-плазмиды <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	14
1.1.4. Механизм переноса Т-ДНК	15
1.1.5. Плазмиды агробактерий как векторы для трансформации	17
1.1.6. Основные компоненты неонкогенных Ti-плазмидных векторов	18
1.1.7. Неонкогенные векторы общего назначения на основе Ti-плазмид, используемые для трансформации растений	18
1.1.8. Векторы для трансформации растений с помощью <i>A. rhizogenes</i>	26
1.1.9. Использование специальных трансформирующих векторов на основе Ti-плазмид	27
1.1.10. Выбор Ti-плазмидной векторной системы агробактерий	29
1.1.11. Клонирование в векторах для трансформации растений	35
1.2. Общие молекулярно-биологические рекомендации	37
1.3. Культивирование и хранение бактериальных штаммов	39
1.3.1. Обеспечение	39
1.3.2. Нарращивание ночных бактериальных культур	40
1.3.3. Рассев бактериальных культур для получения отдельных колоний	40
1.3.4. Длительное хранение бактериальных штаммов	41
1.3.5. Приготовление чашек для селекции бактерий	41
1.4. Препаративное выделение плазмид из <i>E. coli</i> в больших объемах	42
1.4.1. Основные положения	42
1.5. Выделение и очистка рестрикционных фрагментов ДНК для лигирования	49
1.5.1. Основные положения	49
1.5.2. Очистка фрагментов ДНК после гидролиза рестриктазами	49
1.5.3. Удаление 5'-фосфатных групп фрагментов ДНК с помощью фосфатазы из кишечника теленка	50
1.5.4. Электроолюдия рестрикционных фрагментов из агарозных гелей	51
1.5.5. Очистка специфических рестрикционных фрагментов путем фильтрования центрифугированием	53
1.6. Лигирование фрагментов ДНК с векторами для трансформации растений	54
1.6.1. Основные положения	54
1.6.2. Обеспечение	58
1.6.3. Методика (модифицировано по [39])	59
1.7. Введение рекомбинантных плазмид в клетки <i>E. coli</i> с помощью трансформации	61
1.7.1. Основные положения	61
1.7.2. Обеспечение	63

1.7.3. Методика	64
1.8. Быстрое выделение небольших количеств плазмидной ДНК <i>E. coli</i>	67
1.8.1. Основные положения	67
1.8.2. Обеспечение	69
1.8.3. Методика (модифицировано по [10])	70
1.9. Анализ мини-препаратов ДНК с помощью рестрикционного гидролиза и электрофореза в агарозном геле	71
1.9.1. Основные положения	71
1.10. Конъюгационный перенос рекомбинантных плазмид в агробактерии	72
1.10.1. Основные положения	72
1.10.2. Обеспечение	74
1.10.3. Методика	75
1.11. Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из <i>A. tumefaciens</i>	76
1.11.1. Основные положения	76
1.11.2. Обеспечение	76
1.11.3. Методика (модифицирована по [17])	77
1.12. Рестрикционный гидролиз тотальной ДНК агробактерий	78
1.12.1. Основные положения	78
Приложение I [I]	80
Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований	80
Приложение I [II]	82
А. Используемые в примерах бактериальные штаммы	82
Б. Антибиотики, используемые для селекции бактерий	82
Литература	83
 Глава 2. Трансформация клеток двудольных растений с помощью Ti-плазмид <i>Agrobacterium tumefaciens</i> и Ri-плазмид <i>A. rhizogenes</i> . Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Дж. Хэмил	87
2.1. Введение	87
2.1.1. Основные свойства агробактерий и векторов, которые используются для трансформации клеток растений	88
2.1.2. Поведение культивируемых растительных клеток, влияющее на их трансформацию агробактериями	92
2.1.3. Селекция трансформированных тканей и регенерация растений	95
2.1.4. Основные методы трансформации растительных клеток с помощью агробактериальных векторов	103
2.2. Трансформация с помощью онкогенных штаммов дикого типа <i>A. tumefaciens</i> и <i>A. rhizogenes</i>	105
2.2.1. Основные положения	105
2.2.2. Обеспечение	110
2.2.3. Методика	111
2.3. Трансформация больших гетерогенных эксплантатов с помощью неонкогенных Ti-плазмидных векторов	117
2.4. Прямая регенерация трансформированных растений: трансформация листовых дисков табака	119
2.4.1. Основные положения	119
2.4.2. Обеспечение	121
2.4.3. Методика	122
2.5. Регенерация трансформированных растений через стадию каллуса: трансформация эксплантатов проростков льна	130
2.5.1. Основные положения	130

2.5.2. Получение стерильных проростков льна и регенерация из эксплантатов проростков льна	132
2.5.3. Трансформация гипокотилей, регенерация из трансформированного каллуса, селекция, размножение и укоренение трансформированных побегов	135
2.6. Трансформация малых гомогенных эксплантатов	140
2.6.1. Основные положения	140
2.6.2. Разработка систем совместного культивирования	141
2.7. Выделение мезофильных протопластов табака	143
2.7.1. Основные положения	143
2.7.2. Обеспечение	145
2.7.3. Методика	146
2.8. Культивирование мезофильных протопластов табака	149
2.8.1. Основные положения	149
2.8.2. Обеспечение	150
2.8.3. Методика	150
2.9. Трансформация протопластов путем совместного культивирования с агробактериями	151
2.9.1. Основные положения	151
2.9.2. Обеспечение	152
2.9.3. Методика	153
2.10. Трансформация клеток суспензионной культуры моркови	160
2.10.1. Основные положения	160
2.10.2. Инициация проэмбриогенных суспензионных клеточных культур моркови, приготовление фидерных чашек и высев на переносные диски	165
2.10.3. Инокуляция клеток моркови агробактериями, селекция трансформантов и регенерация путем соматического эмбриогенеза	167
Приложение 2 [I]	170
Обычные материалы для работы с культурой тканей	170
Приложение 2 [II]	171
Среда для культуры растительных клеток и тканей	171
Приложение 2 [III]	175
Антибиотики, добавляемые в среды для культур растительных клеток	175
Приложение 2 [IV]	176
Подготовка эксплантатов для инокуляции агробактериями	176
Приложение 2 [V]	178
Растворы для выделения протопластов табака	178
Приложение 2 [VI]	179
Выделение протопластов из измельченных кусочков листа	179
Приложение 2 [VII]	180
Методы флуоресцентного окрашивания для контроля развития растительных протопластов	180
Приложение 2 [VIII]	181
Примеры процедур генетической трансформации растений, основанных на системе переноса генов агробактерий	181
Литература	181
Глава 3. Трансформация растительных клеток путем трансфекции ДНК. <i>Дж. Дрейпер, Р. Скотт, А. Кумар, Г. Дьюри</i>	194
3.1. Введение	194
3.1.1. Ограничения системы трансформации с помощью агробактерий	194
3.1.2. Трансформация растительных протопластов изолированной векторной ДНК	196

3.1.3. Разработка стратегий трансформации протопластов путем трансфекции ДНК	197
3.1.4. Векторы для переноса генов посредством ДНК (DMGT-векторы)	199
3.1.5. Трансформация интактных растительных тканей DMGT-векторами	201
3.2. Трансфекция протопластов с помощью полиэтиленгликоля	203
3.2.1. Основные положения	203
3.2.2. Стимулируемое ПЭГ поглощение ДНК протопластами	205
3.2.3. Выделение ДНК из протопластов и дот-блоттинг-гибридизация	206
3.3. Трансформация протопластов с помощью электропорации	212
3.3.1. Основные положения	212
3.3.2. Оптимизация методик электропорации с помощью временной экспрессии	216
3.4. Трансформация растительных клеток путем микроинъекций	221
3.4.1. Основные положения	221
3.4.2. Трансформация растений путем микроинъекций	223
Приложение 3 [I]	232
Выделение протопластов из клеток суспензионной альбинотической культуры <i>Petunia hybrida</i> (сорт Blue Lace)	232
Литература	232
Глава 4. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений. Дж. Дрейнер, Р. Скотт	236
4.1. Введение	236
4.1.1. Выделение ДНК	236
4.1.2. Выделение РНК	238
4.2. Выделение тотальной ДНК из лиофилизированных тканей растений	239
4.2.1. Общие положения	239
4.2.2. Выделение небольших количеств ДНК с помощью СТАВ-буфера	241
4.2.3. Выделение ДНК с помощью протеиназы	245
4.3. Выделение ДНК из свежего растительного материала	248
4.3.1. Общие положения	248
4.3.2. Выделение больших количеств тотальной ДНК из свежего растительного материала с помощью СТАВ-буфера	249
4.3.3. Выделение ДНК из свежих тканей с помощью ДСН	249
4.3.4. Выделение ДНК из свежих тканей с помощью ДСН и протеиназы К	252
4.4. Выделение ядерной ДНК	254
4.4.1. Выделение ядерной ДНК из свежих каллусов или листьев	254
4.4.2. Выделение ядерной ДНК из протопластов	257
4.5. Выделение ДНК из хлоропластов и митохондрий	258
4.5.1. Общие положения	258
4.5.2. Обеспечение	259
4.5.3. Методика	260
4.6. Определение концентрации ДНК в неочищенных препаратах нуклеиновых кислот с помощью дифениламина	262
4.6.1. Общие положения	262
4.6.2. Обеспечение	263
4.6.3. Методика	264
4.7. Выделение тотальной РНК из растений	265
4.7.1. Общие положения	265
4.7.2. Фенольный метод выделения тотальной РНК из растений	265
4.7.3. Метод выделения тотальной РНК из растений при помощи хлористого лития	269

4.8. Выделение poly(A) ⁺ -мРНК	270
4.8.1. Общие положения	270
4.8.2. Обеспечение	271
4.8.3. Методика	272
Приложение 4 [I]	273
Выделение больших количеств тотальной ДНК из клеток растений с помощью СТАВ	273
Приложение 4 [II]	274
Очистка ДНК из растений в градиентах CsCl/БЭ	274
Литература	276
Глава 5. Анализ ДНК путем рестрикции и гибридизации по Саузерну.	
Р. Скотт	277
5.1. Введение	277
5.2. Обработка ДНК ферментами рестрикции	278
5.2.1. Общие положения	278
5.2.2. Обеспечение	279
5.2.3. Методика	279
5.3. Фракционирование ДНК методом электрофореза в агарозном геле	280
5.3.1. Общие положения	280
5.3.2. Обеспечение	281
5.3.3. Методика	282
5.4. Блоттинг по Саузерну обработанных рестриктазами и разделенных фрагментов ДНК	287
5.4.1. Общие положения	287
5.4.2. Обеспечение	288
5.4.3. Методика	289
5.5. Гибридизация ДНК, перенесенной на мембраны с помощью блоттинга по Саузерну	293
5.5.1. Общие положения	293
5.5.2. Обеспечение	293
5.5.3. Методика	295
5.6. Мечение препаратов для гибридизации с помощью олигонуклеотидной затравки	297
5.6.1. Общие положения	297
5.6.2. Обеспечение	298
5.6.3. Методика	299
Приложение 5 [I]	301
Буферы для рестриктаз	301
Приложение 5 [II]	302
Концевое мечение маркеров, полученных на основе ДНК фага λ	302
Приложение 5 [III]	302
Определение включения метки в ДНК	302
Литература	303
Глава 6. Анализ организации и экспрессии генов растений. Р. Скотт, Дж. Дрейпер, Р. Джефферсон, Г. Дьюри, Л. Джэкоб	304
6.1. Введение	304
6.1.1. Принцип организации генов растений	304
6.1.2. Строение мРНК	306
6.1.3. Перенос продуктов генов в клетке	306
6.1.4. Использование генетической трансформации для изучения экспрессии генов растений	307
6.1.5. Использование трансгенных растений для изучения последовательностей, регулирующих транскрипцию	308
6.1.6. Изучение регуляторных последовательностей с помощью индикаторных генов	308

6.2. Изучение организации Т-ДНК методом блоттинг-гибридизации по Саузерну	311
6.2.1. Общие положения	311
6.2.2. Организация последовательностей чужеродной ДНК в тканях растений	313
6.2.3. Изучение организации Т-ДНК в трансгенных растениях моркови методом блоттинг-гибридизации	317
6.3. Анализ экспрессии генов методом точечного нозерн-блоттинга	324
6.3.1. Регуляция транскрипции гена <i>Ca3</i> в этиолированном растении гороха под действием фитохрома	326
6.4. Использование CAT в качестве индикаторного гена для изучения контроля экспрессии генов в различных органах и при изменении условий среды	331
6.4.1. Общие положения	331
6.4.2. Определение активности хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)	333
6.4.3. Примеры использования <i>cat</i> в качестве индикаторного гена для изучения контроля экспрессии гена <i>Ca3</i> в различных органах и в зависимости от условий среды	336
6.5. Применение неомицинофосфотрансферазы-II (NPT-II) в качестве индикаторного белка для изучения роли последовательностей, участвующих в переносе белков (транзитных пептидов)	340
6.5.1. Общие положения	340
6.6. Выделение интактных хлоропластов табака	343
6.6.1. Общие положения	343
6.6.2. Обеспечение	344
6.6.3. Методика	345
6.7. Определение активности NPT-II <i>in situ</i>	346
6.7.1. Общие положения	346
6.7.2. Неденатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле	347
6.7.3. Определение NPT-II <i>in situ</i> после электрофореза	352
6.8. Определение NPT-II методом вестерн-блоттинга	357
6.8.1. Общие положения	357
6.9. Получение химерных генов с последовательностями, кодирующими индикаторный фермент: система слияния с геном GUS	362
6.9.1. Общие положения	363
6.9.2. Слияние с геном GUS	364
6.9.3. Определение активности GUS в экстрактах растений	366
6.9.4. Выделение GUS из тканей растений	366
6.9.5. Флуориметрическое определение активности GUS	368
6.9.6. Выявление GUS <i>in situ</i> с использованием денатурирующего полиакриламидного геля	371
6.9.7. Гистохимическое выявление GUS на срезах тканей растений	374
6.10. Определение нопалина в трансформированных растительных тканях	377
6.10.1. Общие положения	377
6.10.2. Обеспечение	378
6.10.3. Методика	379
Приложение 6 [I] Нозерн-блоттинг	383
Приложение 6 [II] Выделение NPT-II и CAT из бактерий	385
Приложение 6 [III] Определение концентрации белка по Бредфорду	386

Приложение 6 [IV]	386
Определение агропипа и маниопипа	386
Литература	387
Список фирм, поставщиков реактивов и оборудования	391
Предметный указатель	395
Указатель латинских названий	398
Указатель методик	400

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».

Учебное издание

Джон Дрейпер, Родерик Скотт,
Филип Армитидж и др.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ. ЛАБОРАТОРНОЕ РУКОВОДСТВО

Под редакцией Дж. Дрейпера, Р. Скотта,
Ф. Армитиджа, Р. Уолдена

Зав. редакцией М. Д. Гроздова
Научн. редактор М. А. Серова
Мл. научн. редактор М. С. Карнюшина
Художник А. В. Захаров
Художественный редактор А. Я. Мусин
Технический редактор А. Л. Гулина
Корректор М. Е. Савина

ИБ № 7445

Сдано в набор 24.12.90. Подписано к печати 15.05.91. Формат 60×90^{1/16}. Бумага кн.-журнальная. Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем 12,75 бум. л. Усл. печ. л. 25,5. Усл. кр.-отт. 25,5. Уч.-изд. л. 27,0. Изд. № 4/7081. Тираж 3100 экз. Зак. 725. Цена 6 р. 90 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» В/О «Совзкспорткнига» Государственного комитета СССР по печати.
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Государственного комитета СССР по печати. 113105, Нагатинская ул., д. 1.